



Università di Pisa

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

***Farmacocinetica ed effetto ex vivo del cimecoxib
nella specie equina.***

Candidato:

Jacopo Manetti

Relatori:

Dott.ssa Micaela Sgorbini

Dott. Mario Giorgi

Anno accademico 2013 – 2014

Riassunto

Parole chiave: Cimicoxib, HPLC, plasma canino, farmacocinetica.

Il cimicoxib (CX) è un inibitore selettivo della COX-2 utilizzato per l'infiammazione e il dolore nel cane. Gli obiettivi del presente studio sono stati quelli di valutare la sua farmacocinetica e dinamica in 5 cavalli e farmacocinetica in 6 asini al dosaggio di 2 e 5 mg/kg. Il farmaco è stato somministrato per OS tramite sonda naso-gastrica agli animali cibati e non cibati seguendo un periodo di wash-out di 15 giorni in accordo con un disegno di studio a cross over.

La quantificazione del CX è avvenuta attraverso la metodica HPLC accoppiata con rilevatore a fluorescenza eseguita su plasma e liquido sinoviale. Il limite di quantificazione per il CX è stato di 25 ng/mL. Non è stato rilevato alcun effetto avverso negli animali. Le concentrazioni plasmatiche di CX non sono state rilevate dose dipendenti nelle due specie animali. Il digiuno non ha influenzato significativamente l'assorbimento totale del farmaco se non nel suo Tmax. Il CX è stato quantificato nel liquido sinoviale del cavallo a concentrazioni 1.6-20 volte minori rispetto al plasma. Il CX nonostante abbia mostrato concentrazioni plasmatiche molto inferiori alla concentrazione minima efficace nel cane, è riuscito ad inibire significativamente entrambi gli enzimi ciclossigenasici.

In conclusione la non selettività verso l'enzima COX-2 nel cavallo penalizza l'utilizzo di questo farmaco nella pratica clinica. Nell'asino le concentrazioni plasmatiche estremamente basse ne suggeriscono una ridotta efficacia clinica. Comunque ulteriori studi in entrambe le specie sono necessari per valutare il completo profilo cinetico e dinamico.

Abstract

Keywords: Cimicoxib, HPLC, canine plasma, pharmacokinetic.

Cimicoxib (CX) is a selective COX-2 inhibitor drug used in the treatment of inflammation and pain in dogs. The aims of the present study were to evaluate the pharmacokinetic and pharmacodynamic of CX in 5 horses and its pharmacokinetic in 6 donkeys at dosages of 2 and 5 mg/kg. The drug was administered *per OS* via nasogastric tube in fed and fasted animals. The drug administration was followed by a 15 days wash-out period according to a cross-over study. CX quantification on both plasma and synovial fluid was carried out by HPLC technique coupled with fluorescence detector. The threshold of CX quantification was 2,5 ng/mL. No adverse effects were detected in all the treated subjects. CX plasma concentration was not dose-dependent in both species. Fasting status did not significantly influenced the total drug absorption except for the Tmax. After 5 mg/kg administration, CX quantification in the synovial fluid was 1.6-20 times lower than in plasma. Despite CX showed lower plasma concentration than minimum effective concentration reported in the dog, it was sufficient to inhibit both cyclooxygenase enzymes. In conclusion, the lack of COX-2 selectivity in the horse discourages the use in daily clinical practice, while extremely low CX plasma concentrations in the donkey suggests a reduced clinical efficacy. Nevertheless, further studies are required to evaluate the complete kinetic and dynamic profile of CX in both species.

INDICE

1. Introduzione	p. 4
1.1 L'infiammazione nel cavallo	p. 5-8
1.1.1 Autacoidi dell'infiammazione	p. 9
1.1.2 Eicosanoidi: struttura, biosintesi e vie metaboliche	p. 10-12
1.1.3 Cicloossigenasi	p. 13-15
1.2 Farmaci anti-infiammatori nel cavallo	p. 16-18
1.2.1 FANS	p. 19-21
1.2.2 FANS tradizionali	p. 22-26
1.2.3 FANS specifici	p. 27-34
1.3 I COXIBs	p. 35-36
1.3.1 COXIBs di prima generazione	p. 37
1.3.2 COXIBs di seconda generazione ad uso veterinario	p.37
1.3.2.1 Firocoxib	p. 38-39
1.3.2.2 Deracoxib	p. 40
1.3.2.3 Mavacoxib	p. 41
1.3.2.4 Robenacoxib	p. 42-44
1.3.2.5 Cimicoxib	p. 45-47
1.3.3 Cimicoxib: stato dell'arte in medicina veterinaria	p. 48-50
2. Scopo della tesi	p. 51
3. Materiali e metodi	p. 52
3.1 Sperimentazione animale ed in laboratorio	p. 53
3.1.1 Sperimentazione animale	p. 53
3.1.1.1 Animali	p. 53
3.1.1.2 Gestione animali	p. 53
3.1.1.3 Protocollo sperimentale	p. 54-59
3.1.2 Chimica e Reagenti	p. 60
3.1.3 Soluzioni standard	p. 61
3.1.4 Tampone e soluzioni per estrazione	p. 62
3.1.5 Strumentazione	p. 63
3.1.5.1 HPLC- FL	p. 64
3.1.6 Validazione del metodo	p. 65-66
3.1.7 Metodo per la determinazione delle concentrazioni di analita nei campioni	p. 67
3.1.8 Procedura di estrazione ottimizzata	p. 86-69
3.1.9 Valutazione farmacocinetica ed analisi statistica	p. 70

1. Introduzione

1.1 L'infiammazione nel cavallo

La risposta infiammatoria è uno dei meccanismi di difesa animale e si attiva ogni qual volta un patogeno oltrepassa le difese dell'organismo, rappresentate principalmente dall'apparato tegumentario e dalle mucose dell'apparato respiratorio e digerente. L'attivazione di questa risposta è volta alla neutralizzazione ed all'eliminazione del patogeno, nonché al ripristino della normale funzionalità dell'apparato colpito. In base alla durata del processo infiammatorio possiamo riconoscere due tipi di infiammazione: l'infiammazione *acuta* e l'infiammazione *cronica* (Stephen Reed et al., 2004). Nel primo caso la durata del processo varia da poche ore a pochi giorni e le sue caratteristiche principali sono la fuoriuscita dai vasi di liquido ricco di elettroliti e proteine plasmatiche, la diapedesi dei leucociti ed in particolar modo dei neutrofili e i conseguenti rapidi processi riparativi che portano alla guarigione in breve tempo. Nel secondo caso invece il processo assume una lunga durata che può essere espressa nell'ordine di settimane e talvolta mesi, le caratteristiche principali di questo tipo di infiammazione sono la necrosi, l'essudazione cellulare linfocitaria e macrofagica ed infine la riparazione tissutale che può portare alla guarigione dei tessuti danneggiati con formazione di tessuto di granulazione e fibrosi (Jorg Auer e John Stick., 2014). L'infiammazione cronica è spesso la diretta conseguenza dell'infiammazione acuta nei casi in cui quest'ultima non determini la neutralizzazione della noxa patogena. La risposta dell'organismo allo stimolo nocivo subito, porta alla manifestazione dei cinque segni cardinali tipici del processo infiammatorio, i quali sono:

- Calor: aumento della temperatura locale, dovuto all'aumentata vascolarizzazione.
- Tumor: gonfiore determinato dalla formazione dell'essudato o dell'edema.
- Rubor: arrossamento legato all'iperemia attiva e all'aumentato metabolismo cellulare.
- Dolor: indolenzimento provocato dalla compressione o dall'intensa stimolazione delle terminazioni sensitive, da parte dell'agente infiammatorio e dei componenti dell'essudato.

- Funcitio laesa: compressione funzionale della zona colpita. L'occorrenza di questo evento dipende dal sito e dall'estensione della lesione (Donald Mc Gavin and James Zachary., 2008).

La successione di eventi della risposta infiammatoria può essere così descritta:

- Vasodilatazione: il danno tissutale dà luogo al rilascio di mediatori (**autacoidi**) che provocano la vasodilatazione, al fine di ridurre la velocità del flusso sanguigno attraverso l'aumento della pressione idrostatica. La vasodilatazione, inoltre, aiuta la disposizione dei leucociti lungo le pareti dei vasi. I mediatori coinvolti in questo processo sono: istamina, prostaciline (Pgl₂) e ossidi di azoto (NO₂).
- Aumento della permeabilità vascolare: causato dal rilascio di istamina, leucotrieni (C₄, D₄, E₄), bradichinine, tumor necrosis factor (TNF) e interleuchine (IL-1). L'aumento della permeabilità causa il passaggio dei fluidi all'interstizio causa dell'aumento del livello proteico interstiziale. Questo meccanismo determina una diminuzione della pressione osmotica del sangue e aumentata pressione osmotica nell'interstizio, causando un ulteriore travaso di liquidi che porta all'edema.
- Migrazione dei globuli bianchi dai vasi ai tessuti molli infiammati: questa fase necessita una successione di quattro passaggi, a loro volta dipendenti da mediatori:
 - *Chemiotassi*: il processo per cui i globuli bianchi sono attratti al sito dell'infiammazione. I mediatori coinvolti sono il C5a (componente del complemento), leucotriene B₄, IL-8. Tali mediatori attivano i recettori della proteina-G, quindi l'attivazione della GTP-asi che in definitiva risulta nella polimerizzazione dell'actina.
 - *Rolling*: contatto casuale ed intermittente dei globuli bianchi con l'endotelio, prevalentemente dovuto alla loro disposizione lungo le pareti vasali per la stasi sanguigna.
 - *Pavementing*: contatto stretto e costante dei globuli bianchi con l'endotelio.
 - *Transmigration*: attraversamento dello strato endoteliale da parte dei globuli rossi (Walter et al., 2008).

A seconda dell'agente in questione, del sito colpito, delle condizioni dell'organismo e della velocità dell'eventuale risoluzione, l'infiammazione acuta può avere può avere aspetti diversi secondo il tipo di essudato prodotto (siero, fibrina, muco, sangue, pus o combinazione fra due o più dei componenti) e sono così classificati:

- Infiammazione sierosa: liquido a scarso contenuto proteico derivato da siero e secrezioni delle cellule mesoteliali. Sono interessati i tessuti lassi e prevede la componente liquida.
- Infiammazione fibrinosa: interessa il tessuto polmonare e le membrane sierose, prevale accumulo di fibrina associata ad accumulo sieroso.
- Infiammazione catarrale: interessa le mucose secernenti muco, prevale muco.
- Infiammazione emorragica: colpisce prevalentemente polmoni e vasi sanguigni (vasculite) e pancreas, prevale danno ai vasi con emorragia.
- Infiammazione purulenta: caratterizzata da un'intensa infiltrazione di polimorfonucleati, il centro dell'infiammazione diventa una cavità piena di pus contenente tessuto necrotico e polimorfonucleati. Causata da batteri pirogeni.
- Infiammazione gangrenosa (necrosi molto estesa): si verifica quando sul tessuto necrotico, durante l'infiammazione acuta, si impiantano batteri particolari come *Clostridium* spp. La risoluzione dell'infiammazione si ha per ritorno alla normale permeabilità del vaso, drenaggio linfatico, pinocitosi, fagocitosi ed eliminazione e rimozione dei macrofagi. (Tortora e Anagnostakos, 1990)

Senza l'infiammazione lesioni ed infezioni non guariranno mai, analogamente, la progressiva distruzione del tessuto (contemporanea a tentativi di riparazione nell'infiammazione cronica) comprometterebbe la sopravvivenza dell'organismo.

L'infiammazione, acuta o cronica, pur essendo un importante meccanismo protettivo dell'organismo contro i potenziali agenti nocivi, può dar luogo a condizioni patologiche di varia entità. Alcuni esempi sono:

- Ascessi, ulcere e fistole.

- Granuloma causato dall'intensa proliferazione cellulare circoscritta al tessuto fibroso. Una lesione tipica delle infiammazioni croniche, sia di natura infettiva, sia da corpi estranei.
- Malattie allergiche: reazione innescata in modo inopportuno contro sostanze esogene altrimenti innocue (es: rinite allergica).
- Malattie auto immuni: reazione innescata in modo inopportuno contro li stessi tessuti dell'organismo (es: artrite reumatoide).
- Malattie degenerative ed immuno-mediate: nel caso del fallimento nel rimuovere la causa flogogena di base, il processo infiammatorio si cronicizza, con produzione di mediatori e migrazione cellulare incontrollata (es: aterosclerosi); (Stephen Reed et al., 2004).

In tutti questi casi l'infiammazione può arrecare danni anche gravi al soggetto, sia per il dolore che ad esso si associa, sia per il danno tessutale che essa stessa provoca. Nel caso in cui siano interessati organi vitali, o l'organismo sia coinvolto in maniera generalizzata, l'infiammazione può mettere in pericolo la vita del paziente e deve essere attentamente regolata con l'utilizzo di farmaci che siano in grado di ridurre la risposta infiammatoria in atto, o quantomeno, alcune delle sue manifestazioni. (Zizzadoro e Belloli, 2009)

1.1.1 Autacoidi dell'infiammazione

- Termine che deriva dal Greco: Autos = self e Acos = rimedio, cura. Gli **autacoidi** rappresentano i mediatori umorali della comunicazione intercellulare a breve distanza, esercitando la loro azione su bersagli locali, raggiunti per diffusione negli spazi interstiziali e rappresentati da cellule vicine alla sede di produzione (azione paracrina) e/o dalle stesse cellule produttrici (azione autocrina). Generalmente non si trovano nel torrente sanguigno e pertanto indicati anche come “ormoni locali”. Gli autacoidi svolgono il ruolo di protagonisti della reazione infiammatoria e la risposta immunitaria. Oltre all'infiammazione, sono comunque riportati anche eventuali altri fenomeni biologici (fisiologici e fisiopatologici) nei quali il mediatore risulta essere funzionalmente coinvolto, in alcuni casi non come autacoide, ma come neurotrasmettitore o ormone. La conoscenza di tali fenomeni, infatti, è necessaria per comprendere gli effetti collaterali indesiderati dei farmaci usati per il controllo dell'infiammazione e/o eventuali altri loro campi di applicazione terapeutica (Donald Mc Gavin e James Zachary., 2008).

Gli autacoidi sono suddivisi per categorie chimiche in ammidici, lipidici, peptidici e di altra natura.

Autacoidi ammidici: istamina [2-(4-imidazoil)etilamina], serotonina (5-idrossitriptamina).

Autacoidi lipidici: eicosanoidi (prostaglandine o Pg, prostacicline, leucotrieni, trombossani, lipossine, epossiline, vari idroperossi-/idrossi-/epossidi acidi), fosfolipidi modificati: prodotti della trasformazione di alcuni fosfolipidi che a partire da componenti strutturali delle membrane cellulari diventano composti dotati di attività biologica (fattore di attività piastrinica o PAF – Platelet Activating Factor ed altri).

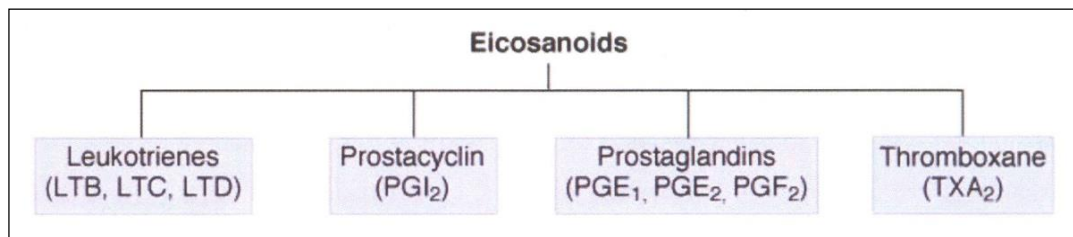
Autacoidi peptidici: fattori di crescita non emopoietici (EGF – Epidermal Growth Factor, NGF – Nerve Growth Factor), citochine (IL – interleuchine, IFN – interferoni, TNF_{α} – Tumor Necrosis Factor).

Altri autacoidi: Ossido Nitrico (NO), radicali liberi dell'ossigeno o ROS – Reactive Oxygen Species (Zizzadoro e Belloli, 2009).

1.1.2 Eicosanoidi: struttura, biosintesi e vie metaboliche

Sono tutti derivati del metabolismo ossidativo di alcuni acidi grassi polinsaturi a venti atomi di carbonio (eikosi in Greco = 20). Attualmente le conoscenze più complete si hanno in particolare per i **prostanoidi** che includono nel loro insieme le seguenti molecole: prostaglandine, trombossani, prostacicline ed i leucotrieni. (**Figura 1**). Queste classi di eicosanoidi rappresentano il bersaglio di farmaci con diffuso e consolidato impiego in medicina umana e veterinaria, tra cui i FANS. Per altri eicosanoidi di più recente identificazione le conoscenze al momento disponibili sono per lo più limitate alle modalità di sintesi, mentre il significato biologico della loro produzione è, sotto molti aspetti, ancora oscuro (Walter H. Hsu and Arthi Kanthasamay., 2008).

Figura 1 Rappresentazione schematica degli eicosanoidi [Anonymous, 2010a].



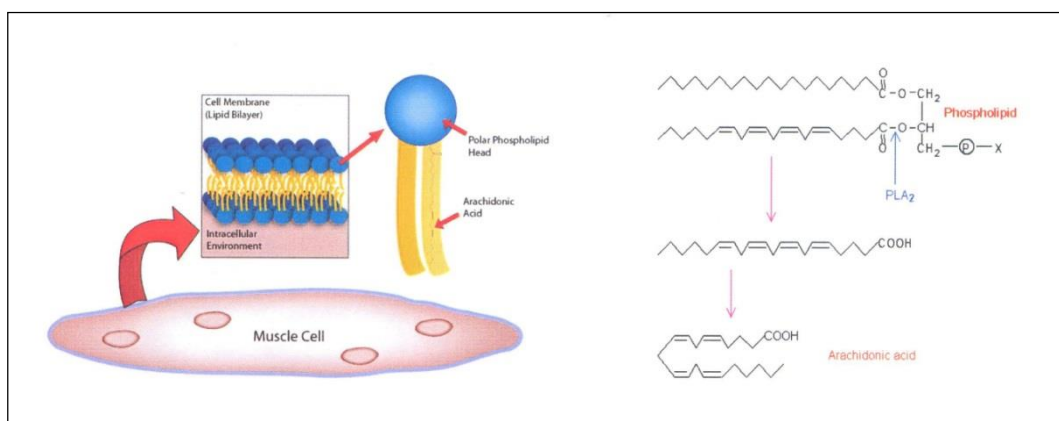
Gli acidi grassi polinsaturi che rappresentano i precursori biosintetici degli eicosanoidi sono: acido diomo- γ -linoleico, acido timodonic ed acido arachidonico. Nella maggior parte delle specie animali l'acido arachidonico (AA) è il precursore più abbondante e, pertanto, gli eicosanoidi si identificano in larga misura con i derivati di questo acido grasso. Nei tessuti, l'AA si trova prevalentemente nei fosfolipidi delle membrane cellulari, esterificato con l'ossidrile in posizione 2 dello scheletro carbonilico del glicerolo. Affinché la sintesi degli eicosanoidi possa avere luogo, è necessario che l'AA venga liberato dai fosfolipidi di membrana grazie all'enzima fosfolipasi A₂ (PLA₂), che caratterizza in maniera specifica l'idrolisi del legame estereo in posizione 2 del glicerolo (**Figure 2-3**).

Figura 2

La “liberazione” dell’acido arachidonico.
chimica.

Figura 3

Da fosfolipide a AA. Reazione



Gli stimoli che attivano questo enzima possono essere di diversa natura (fisici, chimici, biologici, fisiologici o patologici, endogeni o esogeni). Alcuni agiscono tramite specifici recettori (ormoni, neurotrasmettitori, autocoidi, allergeni, endotossine etc.), mentre altri provocano un’aspecifica perturbazione cellulare (traumi, shock termico, ipossia, agenti chimici, etc.).

L’AA così liberato viene trasformato nelle diverse classi di eicosanoidi, per intervento di specifici sistemi enzimatici, che catalizzano la cosiddetta “cascata dell’AA”; reazioni biochimiche sequenziali in cui il prodotto di una reazione funge da substrato per la reazione successiva. Le vie metaboliche lungo le quali è metabolizzato l’AA sono essenzialmente tre (**Figura 4**), e pertanto il nome degli enzimi che intervengono per primi nella catena di reazioni utilizzano l’AA come substrato.

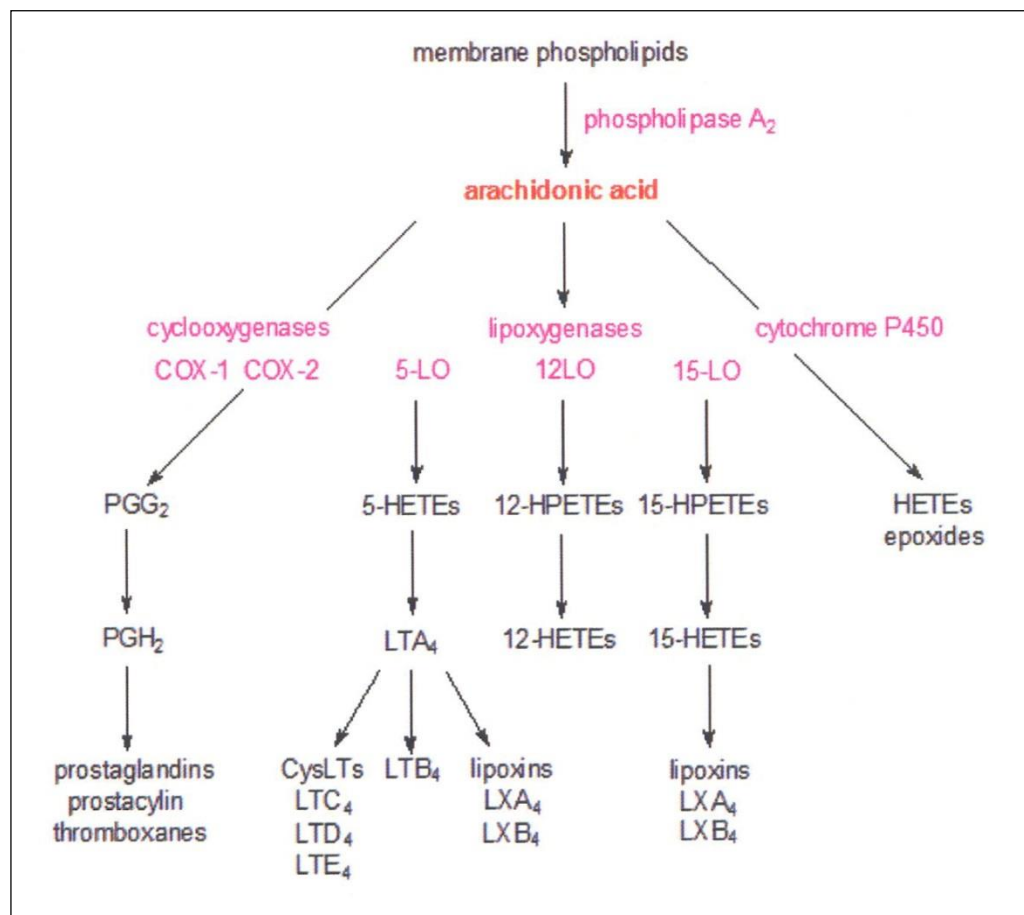
1. La via delle **ciclossigenasi (COX)**, che porta alla formazione dei prostanoidi (**Figura 4**).
2. La via delle **lipossigenasi (LOX)**, che porta alla formazione dei leucotrieni e di altri composti correlati (lipossine, epossine e vari idroperossi- e idrossi-acidi). Le LOX costituiscono una vasta famiglia di enzimi che catalizzano l’ossigenazione dell’AA, trasformandolo in un idro-perossi-acido (acido idro-perossi-eicosa-tetraenoico o HPETE). In base alla specifica posizione in cui l’enzima introduce

l'ossigeno molecolare nella catena carboniosa dell'acido grasso si distinguono diversi tipi di LOX (5-, 8-, 9-, 11-, 12-, 15-LOX), che portano alla formazione dei rispettivi HPETE, di cui i più importanti negli organismi animali sono la 5-, 12- e 15-HPETE. Quindi, per l'attività deidrasica delle LOX (enzimi ad attività bifunzionale) sono ulteriormente trasformati, soprattutto l'acido 5-HPETE, attraverso una serie di reazioni con l'interazione di altri sistemi enzimatici, nei diversi leucotrieni (LT) (LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 , CysLT) e nelle lipossine (LXA_4 , LXB_4) (**Figura 4**).

3. La via del **citocromo P-450 (CYP-450)** monoossigenasico, che porta alla formazione di vari idrossi- ed epossidi-acidi. (**Figura 4**) [Zizzadoro e Belloli, 2009].

Le vie metaboliche meglio conosciute e di maggiore interesse farmacologico sono le vie delle COX e delle LOX.

Figura 4 Le vie metaboliche dell'acido arachidonico.

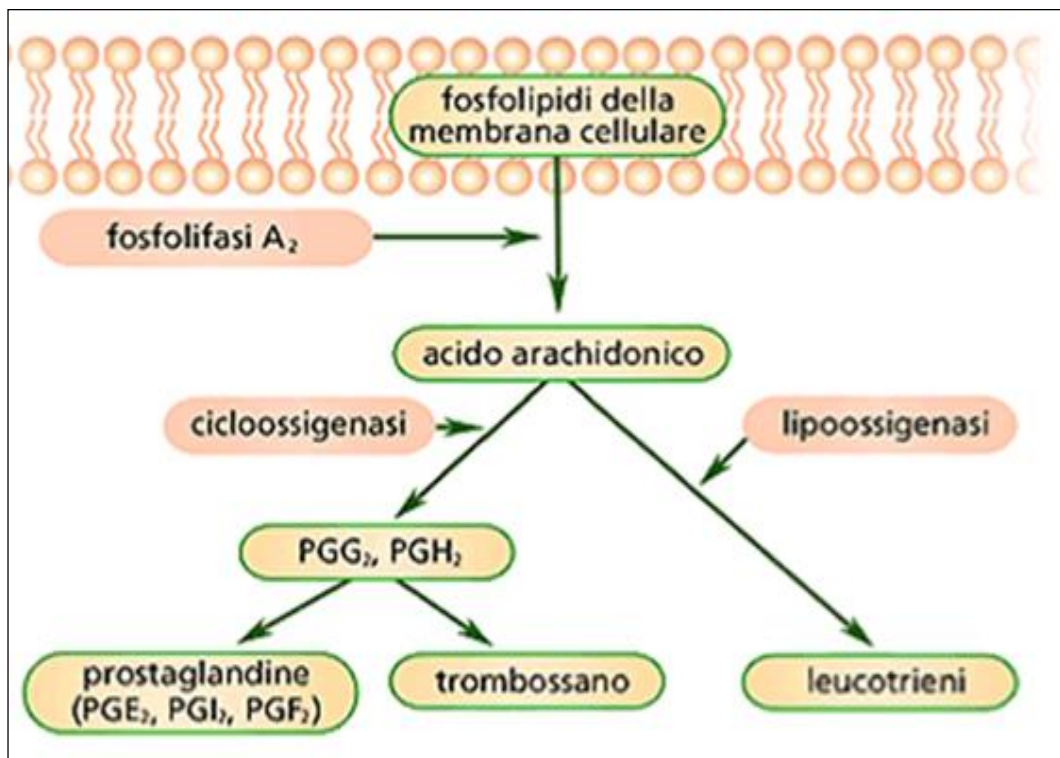


1.1.3 Cicloossigenasi

Questi enzimi sono proteine globulari associate al versante endoluminale delle membrane del reticolo endoplasmatico e del nucleo. Sono bifunzionali, cioè capaci di due attività catalitiche, cicloossigenasica e perossidasica. Le due attività avvengono in successione e portano alla formazione della prostaglandina H_2 (PgH_2); un composto intermedio altamente reattivo, che per intervento di specifici enzimi (PgD -, PgE -, PgF -, PgI - e TxA -sintasi) viene a sua volta trasformato in una serie di prodotti terminali biologicamente reattivi, che diffondono passivamente nell'ambiente extracellulare. Questi prodotti sono indicati nell'insieme come prostanoidi e sono rappresentati da:

- Prostaglandine D_2 , E_2 , $F_{2\alpha}$ (PgD_2 , PgE_2 , $PgF_{2\alpha}$).
- Prostaciline (o prostaglandine I_2 o PgI_2).
- Trombossano A_2 (TxA_2). (**Figura 5**).

Figura 5 La via delle cicloossigenasi con la conseguente sintesi dei vari prostanoidi.



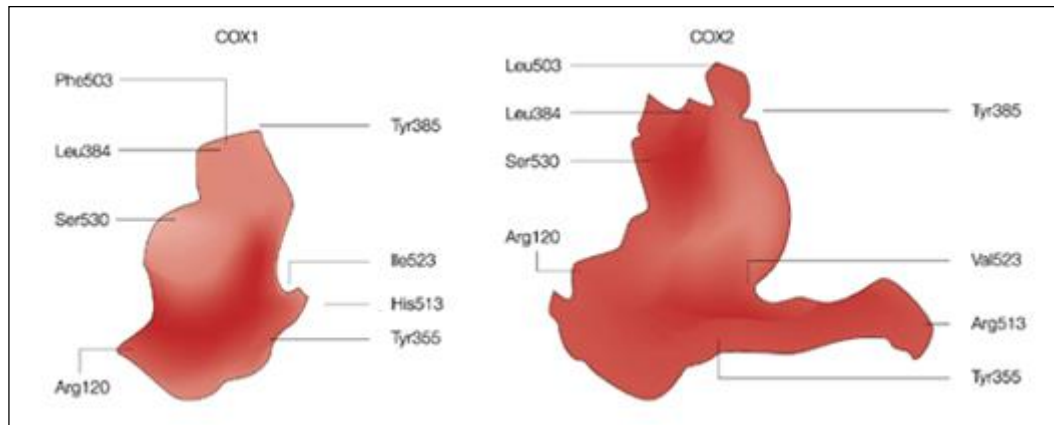
Attualmente si conoscono almeno due isoforme di cicloossigenasi: COX-1 e COX-2. I due isoenzimi svolgono la stessa attività catalitica, agendo sullo stesso substrato e sono molto simili anche nella composizione aminoacidica. Le differenze principali fra le due isoforme per quanto riguarda la distribuzione cellulare e i meccanismi di regolazione della loro espressione molecolare sono:

- La COX-1 chiamata anche “isoforma costitutiva”, è normalmente presente nella quasi totalità delle cellule e dei tessuti dell’organismo animale e, in genere, il suo livello di espressione è costante (pur se variabile da distretto a distretto). La normale espressione delle COX-1 è responsabile della produzione delle prostaglandine con numerose funzioni omeostatiche e regolatrici, con conseguente protezione del tratto gastro-enterico prossimale, del rene e delle piastrine (Mehta et al., 2007).
- La COX-2 denominata “isoforma inducibile”, è stimolata maggiormente in seguito ad una lesione ed infiammazione, benché, in condizioni basali sia espressa in maniera costitutiva in alcuni tessuti (cervello, pareti vasali, rene e tratto riproduttivo femminile) (Mitchell et al., 1993; Seibert et al., 1995; Seibert et al., 1997; Crofford, 1997). Quando indotta in seguito a stimoli adeguati (stimoli pro-infiammatori, mitogeni, fattori di crescita, ormoni, sollecitazioni meccaniche, etc.), la sua espressione diventa apprezzabile soprattutto nelle cellule coinvolte nell’infiammazione (monociti, macrofagi, granulociti, mastociti, fibroblasti, etc.). Tali significativi livelli di espressione superano generalmente quelli delle COX-1 (10-100 volte) presente nell’ambito dello stesso contesto cellulare e/o tissutale e si associa naturalmente ad una produzione di maggiori quantità di prostanoidi (fino a 1000 volte).

Alcune importanti differenze strutturali si osservano a carico del sito dell’attività cicloossigenasica e sono essenzialmente responsabili della differente specificità delle due forme molecolari verso altri substrati e della loro diversa sensibilità all’inibizione farmacologica. Il sito attivo consiste in un canale idrofobico lungo e stretto che si estende dalla parte sferica verso il centro catalitico [Luong et al., 1996; Smith e Song, 2002]. Il canale della COX-2 è più largo e possiede una forma leggermente differente

da quello delle COX-1. Queste differenze fanno sì che si formi una piccola tasca laterale idrofobica fuori dal canale principale, aumentando il volume del sito attivo della COX-2. All'interno della tasca laterale della COX-2 è presente un residuo di arginina al posto dell'His-513 presente nella catena laterale della COX-1 (**Figura 6**) (Rao et al., 2005).

Figura 6 Sequenza degli amminoacidi nella COX-1 e nella COX-2 [Flower, 2003].



Infine va ricordata la recente scoperta di una terza isoforma, la COX-3, che sembra sia codificata dallo stesso gene della COX-1, ma l'mRNA risultante è assemblato in maniera differente. Ancora non si conosce molto riguardo alla sua produzione ed ai suoi effetti biologici. In più altre ricerche suggeriscono l'esistenza di numerose varianti, sia della COX-1 che della COX-2. La comprensione del significato biologico di queste varianti potrà mettere in luce nuovi aspetti della fisiologia di certi tessuti, e pertanto, aprire nuove prospettive nella terapia farmacologica (Zizzadoro e Belloli, 2009).

1.2 Farmaci anti-infiammatori nel cavallo

Qualsiasi farmaco che, interferendo con la sintesi, il rilascio e/o l'azione di uno o più autacoidi dell'infiammazione, sia capace di ridurre i loro effetti, ha la potenzialità di essere un "farmaco anti-infiammatorio".

Ne deriva che tutti quei farmaci che consentono di controllare l'infiammazione (o alcune sue manifestazioni), con particolare efficacia terapeutica e nelle condizioni cliniche più diverse, vengono indicati come farmaci anti-infiammatori.

Attualmente, i farmaci che rispondono a questa definizione sono rappresentati da due classi di composti:

- **FAS (Farmaci Anti-infiammatori a struttura Steroidea)**: sono i glucocorticoidi (GC), utilizzati come agonisti del cortisolo. Gli steroidei surrenali sono sintetizzati (reazione catalizzata da enzimi appartenenti alla famiglia del CYP-450) a partire dal colesterolo, che a sua volta viene trasportato all'interno delle strutture cellulari della corteccia surrenalica da lipoproteine plasmatiche a bassa densità (LDL). I farmaci (GC di sintesi) appartenenti a questa famiglia vengono, ad oggi, generalmente sintetizzati a partire dall'acido colico (di origine animale) e dalle saponine steroidee estratte da piante appartenenti alla famiglia delle Liliacee e delle Dioscoriacee. L'attività anti-infiammatoria dei GC deriva dalla loro capacità di interferire con la sintesi, il rilascio e/o l'azione di più autacoidi contemporaneamente, per lo più delle citochine e degli eicosanoidi, ma anche del nitrossido (NO), Reactive Oxygen Species (ROS – molecole chimicamente reattive contenenti ossigeno) e l'istamina. Tale caratteristica inibisce le funzioni (migrazione, attivazione e proliferazione) di tutte le cellule coinvolte nella reazione infiammatoria e/o immunitaria. Inoltre, in seguito a diversi meccanismi, i GC agiscono su molte funzioni biologiche ed apparati (metabolismo di proteine, carboidrati e lipidi; equilibrio idro-elettrico per la concomitante azione di tipo mineralcorticoide; funzione cardio-vascolare sia attraverso meccanismi diretti, sia mediati dagli effetti mineralcorticoidi; sistema nervoso centrale attraverso effetti metabolici che regolano la concentrazione plasmatica del glucosio necessaria per le funzioni cerebrali; effetti sul sistema linfatico e del sangue; effetti sul

sistema endocrino). Da un lato, questo spettro d'azione così ampio, rende ragione di come i GC siano i farmaci anti-infiammatori più efficaci al momento disponibili e risultino attivi praticamente in tutti i tipi di flogosi (soprattutto quando la responsabilità di una condizione infiammatoria ricade in ugual misura su più autacoidi o quando il mediatore principalmente responsabile del processo patologico non è noto). Dall'altro canto, invece, in virtù della molteplicità e la complessità delle loro azioni farmacologiche e metaboliche, sono numerosi i casi in cui il loro impiego è controindicato o richiede particolare cautela. Sono altrettanto numerose le reazioni avverse e alcune di esse sono: immunosoppressione, iperglicemia, diabete mellito di tipo 2, perdita delle masse muscolare e cutanea, debolezza muscolare, incremento della deposizione di grasso, fragilità capillare per eccessivo catabolismo del collagene capillare, osteoporosi per la riduzione nella fissazione del calcio, sindrome di Cushing, ipertensione, ipokaliemia, ritardo nella crescita, irregolarità del ciclo estrale, calo della libido, depressione, insonnia ed agitazione (Walter H. Hsu and Arthi Kanthasamay., 2008).

- **FANS (Farmaci Anti-infiammatori Non Steroidei)**: in inglese NSAID's – Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, sono largamente utilizzati in medicina umana e veterinaria per la loro riconosciuta efficacia nel produrre effetti anti-infiammatori, analgesici e antipiretici. Ne fanno parte numerose molecole a struttura diversa, per la maggior parte acidi organici deboli che contengono una porzione aromatica non steroidea che conferisce un certo grado di liposolubilità. Dal punto di vista chimico sono eterogenei, ma condividono un comune meccanismo d'azione che li raggruppa nella stessa classe farmacologica. I FANS traggono attività anti-infiammatoria dalla loro capacità di inibire la sintesi dei prostanoidi: questi particolari autacoidi svolgono un ruolo chiave nella genesi della sintomatologia clinica di numerosi tipi di infiammazione, agendo soprattutto come amplificatori degli effetti di altri mediatori comunemente coinvolti nel processo flogistico. Ciò porta alla semplice deduzione che lo spettro dell'attività anti-infiammatoria dei FANS sia meno ampio di quello dei GC, che a loro volta agiscono su più tipi di

autacoidi. Per fare un semplice esempio, i GC sono utili nel trattamento delle allergie mentre i FANS non lo sono. Di conseguenza si può dire che gli effetti farmacologici dei FANS sono più specifici e limitati, perciò, prima della somministrazione è essenziale inquadrare bene la patogenesi dell'affezione, nonché fare attenzione alla specie animale trattata, in quanto esistono delle profonde differenze specie-specifiche nei meccanismi fisiopatologici dell'infiammazione e della risposta immunitaria (diversa sensibilità agli stimoli pro infiammatori, variabilità del tipo e dell'intensità delle reazioni a stimoli di varia natura, diversa incidenza di specifiche patologie su base infiammatoria e/o immunologica, etc.). Queste differenze limitano la trasferibilità dei dati relativi all'efficacia di un trattamento farmacologico da una specie all'altra e rendono necessaria la realizzazione di studi dedicati ad ogni singola specie animale d'interesse (Zizzadoro e Belloli, 2009).

1.2.1 FANS

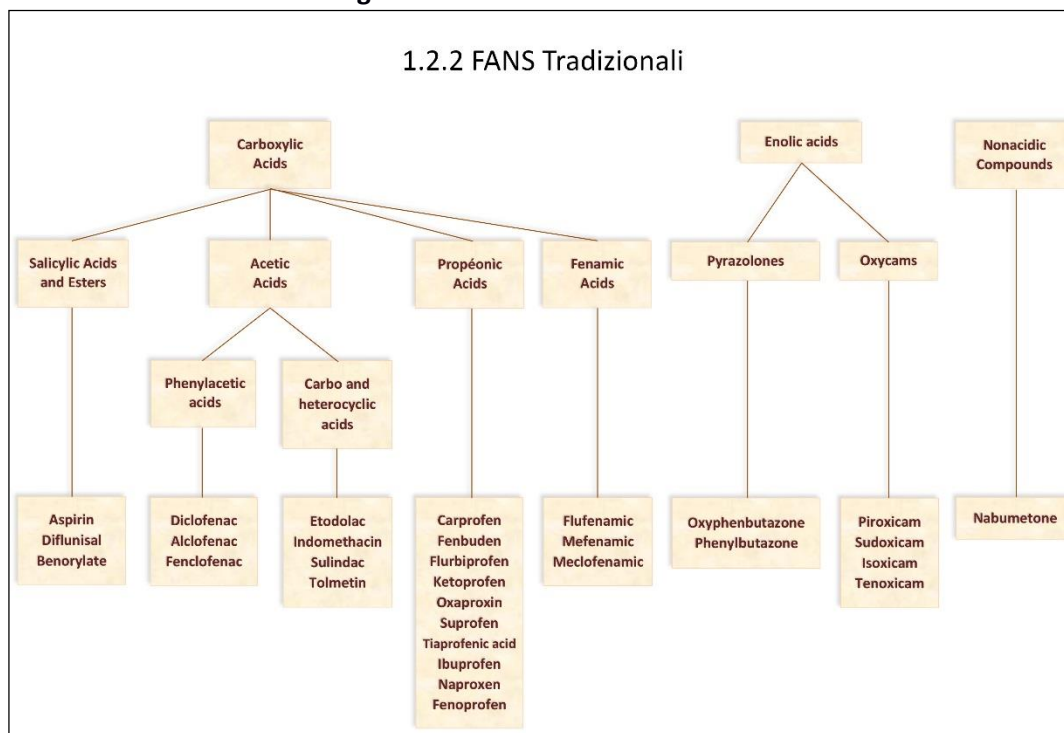
La storia di questa classe di farmaci vede le sue origini nell'antichità. Le prime segnalazioni sono circa l'uso di preparazioni officinali a base di corteccia e foglie di salice come rimedio per ridurre la febbre e alleviare i dolori di varia natura [Zizzadoro e Belloli, 2009]. Col passare degli anni, nel 1829, è stato identificato da Leuroux il principio attivo responsabile delle proprietà terapeutiche (glucoside salicina); con successive manipolazioni chimiche, furono sintetizzati l'alcool salicilico e l'acido salicilico, ma il primo FANS di sintesi introdotto per uso clinico è stato il salicilato di sodio nel 1875. Il seguito è stato sintetizzato nel 1898 da Felix Hoffman dalla "Bayer Pharmaceutical Company" il "progenitore dei FANS moderni": l'acido acetilsalicilico, un derivato acetilato dell'acido salicilico, che è stato introdotto col nome di Aspirina® nell'anno successivo. Da allora, nel tentativo di produrre un farmaco più efficace e sicuro dell'aspirina, sono stati sintetizzati numerosi altri composti che prendono il nome di FANS tradizionali (t-FANS), tuttavia, nessuno di essi ha mai offerto particolari vantaggi, almeno in termini di tollerabilità. Solo nel 1971, Vane descrisse il meccanismo d'azione per la prima volta e quindi l'inibizione della produzione delle Pg, a loro volta derivati dell'AA, attraverso l'inibizione delle COX [Vane, 1971]. È stata questa la scoperta cardinale che ha aperto la strada ai progressi significativi degli ultimi vent'anni. Sono nati così i FANS innovativi che comprendono gli inibitori selettivi delle COX-2 o COXIBs, duplici inibitori e i nitro-FANS. Tali farmaci, rispetto ai t-FANS, sembrano offrire potenziali vantaggi in termini di efficacia e/o tollerabilità (soprattutto gastrica), anche se nessuno di essi può ancora considerarsi farmaco "ideale" per il controllo dell'infiammazione. I FANS innovativi non possono pertanto sostituirsi ai t-FANS (il cui ruolo terapeutico è ancora valido e attuale), ma la loro introduzione ha ampliato la possibilità di scelta del farmaco più adatto per ciascun tipo di paziente e patologia [Zizzadoro e Belloli, 2009].

I FANS sono indicati per entrambi i tipi del dolore: cronico e acuto. Nell'ambito di quest'ultimo possono essere usati singolarmente per il dolore lieve-moderato, oppure in un regime di analgesia "multimodale", combinati con gli oppioidi per il dolore da moderato a severo. Tale combinazione è di grande beneficio perché permette la riduzione del dosaggio degli oppioidi, riducendo i numerosi effetti

collaterali a loro associati come la nausea, il vomito, le vertigini, la confusione, la sonnolenza, la ritenzione urinaria, il prurito e la costipazione [Langford e Mehta, 2006].

Le molecole che appartengono alla classe dei FANS sono numerose e possono essere classificate in base a numerosi criteri: in base alla struttura fisica (**Figura 7**), in base alla selettività per le COX-1 e COX-2 e quindi il meccanismo d'azione, in base all'effetto farmacologico secondo la WHO (grado di effetto analgesico, anti-infiammatorio, anti-piretico) e su base terapeutica (analgesica, anti-coagulanti, anti-piretici, anti-gotta, etc.).

Figura 7 Classificazione dei t-FANS.



Come già visto, tutti i FANS condividono un meccanismo d'azione comune che consiste nell'inibizione delle COX, con conseguente riduzione dei prostanoidei e degli effetti da questi mediati. Il parametro che varia tra un FANS e un altro (e quindi gli attribuisce effetti farmacologici diversi) è invece la selettività per le diverse COX. Utilizzando idonei saggi farmacologici *in vitro*, è possibile studiare separatamente la potenza inibitoria dei vari FANS per la COX-1 e la COX-2. Il rapporto tra i valori di IC₅₀ (concentrazione di farmaco che inibisce del 50% l'attività dell'enzima) per la COX-1 e per la COX-2, determinati per la stessa molecola, (cosiddetto rapporto COX-1/COX-2)

è assunto, per convenzione quale indice della selettività del farmaco per le due diverse isoforme di COX. In base al valore del rapporto COX-1/COX-2, i FANS sono così definiti e classificati:

- Inibitore non selettivo delle COX (rapporto = 1): se risultano equi-potenti verso le COX-1 e le COX-2 ($IC_{50} \text{ COX-1} = IC_{50} \text{ COX-2}$).
- Inibitore preferenziale della COX-1 o inibitore selettivo della COX-1 (rapporto <1 o rispettivamente $<<1$), se sono inibitori più potenti della COX-1 che della COX-2 ($IC_{50} \text{ COX-1} < o << IC_{50} \text{ COX-2}$).
- Inibitore preferenziale della COX-2 o inibitori selettivi della COX-2 (rapporto >1 o rispettivamente $>>1$), se sono inibitori più potenti della COX-2 che della COX-1 ($IC_{50} \text{ COX-1} > o >> IC_{50} \text{ COX-2}$) (Zizzadoro e Belloli, 2009).

Le prime quattro categorie (sottolineate) fanno parte dei FANS tradizionali, l'ultimo invece dei FANS innovativi.

1.2.2 FANS tradizionali

Gli effetti farmacologici dei t-FANS sono essenzialmente tre: antiinfiammatori, analgesici, ed antipiretici a cui si associano altri effetti minori ascrivibili alle singole molecole piuttosto che alla classe nell'insieme. La potenza con cui ogni singolo composto produce questi tre effetti farmacologici, così come le dosi necessarie per produrli possono essere significativamente differenti. Inoltre, non tutti sono in grado di evocare i tre suddetti effetti con uguale efficacia. Ad esempio l'aspirina, spesso considerata la molecola di riferimento di questa classe, e la flunixinina esercitano le tre azioni in una maniera abbastanza bilanciata. Il fenilbutazone, uno dei primi t-FANS introdotti in medicina veterinaria applicata sul cane, è efficace come anti-infiammatorio ed analgesico, ma pressoché privo di attività anti-piretica. Le ragioni di un comportamento farmacologico così diversificato tra i singoli farmaci sono da ricercare nelle differenze del profilo dinamico (e anche cinetico), e nelle caratteristiche biologiche delle loro COX bersaglio (Zizzadoro e Belloli, 2009). Qui di seguito sono raggruppate le caratteristiche principali comuni ai t-FANS:

Effetto anti-infiammatorio: riduzione della vasodilatazione e dell'edema in conseguenza dell'inibizione della sintesi di prostanoidi prodotti e liberati nei tessuti delle cellule resistenti e delle cellule infiammatorie ivi migrate in risposta ad uno stimolo di varia natura. Sono particolarmente efficaci nel controllo della flogosi acuta (o della riacutizzazione di processi infiammatori cronicizzati), riducendo tutte le classiche manifestazioni cliniche (rubor, calor, etc.). Meno efficaci, invece, nelle flogosi croniche in cui l'infiammazione è sostenuta dalla compartecipazione di una serie articolata di mediatori, dove i prostanoidi rivestono un ruolo secondario. Ne consegue un contributo significativo per singoli aspetti della malattia infiammatoria (es. dolore).

Effetto analgesico: efficaci principalmente contro quei tipi di dolore nei quali le Prostaglandine (Pg) sensibilizzano le terminazioni nocicettive, oppure, esercitano un'azione diretta (nel caso della Pgl₂), oppure ancora, abbassano la soglia di

depolarizzazione neuronale (PgE_2 a livello spinale), cioè nel dolore associato all'infiammazione o al danno tissutale.

Effetto anti-piretico: i FANS inibiscono la sintesi delle Pg nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni ipotalamici in risposta a pirogeni esogeni ed endogeni (abbassamento della temperatura solo in caso di febbre senza interferenza con la normale temperatura corporea). Risultano particolarmente efficaci in quel contesto l'aspirina, la flunixinina, il paracetamolo e il dipirone.

Effetto anti-aggregante: avviene per l'inibizione della sintesi COX-1 mediata dai TxA_2 . In relazione a tale applicazione clinica (usata per la terapia di laminite equina, filariosi cardiopolmonare nel cane e miocardiopatia nei felini), la molecola più efficace e utilizzata è l'aspirina. L'acido acetilsalicilico è l'unico FANS che inibisce le COX in maniera irreversibile. Poiché le piastrine mature, prive di nucleo, sono incapaci di sintetizzare nuove COX (come succederebbe in altre cellule nucleate) dopo che quella già espressa è stata acetilata dall'aspirina, la durata del blocco farmacologico è pari alla vita media della piastrina nel torrente circolatorio (9-10 giorni). Ciò permette inoltre la somministrazione di basse dosi in maniera continuativa, permettendo di promuovere un'azione selettiva sulla COX piastrinica senza significativa alterazione dell'attività cicloossigenasica di altre cellule e tessuti.

Effetti collaterali: alle comuni dosi usate in terapia i t-FANS determinano una generalizzata e pressoché totale inibizione dell'attività delle COX-1 e/o COX-2. Il loro utilizzo, pertanto, comporta la riduzione della biosintesi non solo dei prostanoidi che mediano un'infiammazione, dolore e febbre, ma anche di quelli implicati generalmente con funzione omeostatica o compensatoria, nella regolazione di altri processi biologici (cito-protezione gastrica, funzione renale, funzione piastrinica, etc.). Di conseguenza, questi farmaci sono spesso responsabili dell'insorgenza di importanti e ben noti effetti collaterali, per lo più indesiderati che si manifestano principalmente a carico del tratto gastrointestinale (ulcere e/o perforazioni della parete gastro-duodenale, ulcere "a stampo" per la natura acida di questi farmaci, rallentamento della mobilità intestinale predisponente a coliche nel cavallo), del rene

(ischemia renale e grave insufficienza renale acuta nei soggetti con funzionalità renale prostaglandino-dipendente, ritenzione idro-salina, riduzione dell'efficacia di farmaci anti-ipertensivi) e delle piastrine (allungamento del tempo di sanguinamento). Accanto ai tre classici apparati eventualmente affetti sono state descritte altre reazioni avverse che possono presentarsi con incidenza e gravità variabili, sempre nell'ambito dei dosaggi terapeutici e che non necessariamente sono legate all'inibizione delle COX: reazioni cutanee, danni alle cartilagini articolari, rallentamento dei processi di guarigione delle fratture, "asma da aspirina" (Zizzadoro e Belloli, 2009). Sebbene non siano stati confermati effetti teratogeni, studi sui roditori hanno dimostrato anche la crescita della mortalità neonatale e un aumento degli aborti (Chavez e DeKorte, 2003).

Farmacocinetica: benché i t-FANS siano raggruppati in numerose diverse classi chimiche e abbiano differenze nella cinetica, il comportamento cinetico dei t-FANS mostra degli aspetti grosso modo comuni a tutte le molecole, con alcune peculiarità, tuttavia, legate a singoli composti o, più spesso, specie-specifiche. Tutti sono acidi organici deboli quando somministrati, con pKa compresa tra 3-6 (tranne uno, il nabumetone che è un pro farmaco chetonico metabolizzato nella forma attiva acida). Nei megaloblasti, a causa dell'ambiente gastrico acido ($\text{pH} < 3$), associato alla liposolubilità e il pKa e dei t-FANS, l'assorbimento orale è rapido (picchi plasmatici a partire da 1 ora) con una biodisponibilità orale dell'80% in media. Di conseguenza la via di somministrazione più utilizzata in molti animali è la via orale. Nei poligastrici e negli erbivori, in cui l'assorbimento è ritardato o irregolare è invece sconsigliata, preferendo la via parenterale disponibile in commercio (IM, SC, IV, etc.). Il pH fisiologico favorisce la dissociazione del farmaco, per cui nel torrente circolatorio si trovano nella forma dissociata (ionizzati), legati in massima parte (>98%) alle proteine plasmatiche. Solo la parte non legata alle proteine è biologicamente attiva. Questo fatto si traduce da un lato in un limitato volume di distribuzione (che non limita però il raggiungimento di concentrazioni efficaci nel sito dell'infiammazione, dove l'aumentata permeabilità vasale permette il passaggio delle proteine plasmatiche nell'interstizio) e dall'altro dalla possibile competizione con altri farmaci legati anch'essi alle proteine plasmatiche. La quantità totale del farmaco assorbita viene

eliminata dall'organismo in massima parte attraverso processi di metabolismo che si svolgono principalmente in sede epatica. Alcuni farmaci vanno incontro a reazioni di fase I (ossidazione, riduzione, idrolisi, etc.) seguiti da reazioni di fase II (coniugazione), e altri, direttamente, solo alla glucuronoconiugazione. Il metabolismo poi procede, per la maggior parte, con l'intervento dei CYP3A o CYP2C. La principale via di escrezione dei t-FANS e dei loro metaboliti (per la maggior parte come metaboliti inattivi, limitata escrezione del farmaco parenterale), è la via urinaria tramite processi sia di trasporto tubulare attivo, sia di filtrazione glomerulare (Katzung et al., 2009). L'eliminazione è pH dipendente e quindi più lenta nel cane, se paragonato agli erbivori, il cui pH urinario è più basico. Nel cane i glucuronidi derivati da alcuni composti (indometacina, naproxene, ibuprofene, piroxicam) subiscono un'eliminazione prevalentemente biliare e un importante ricircolo entero-epatico. Una caratteristica importante dei t-FANS è la persistenza del loro effetto anti-infiammatorio e analgesico oltre la durata prevista secondo l'emivita (Lees et al., 2004).

Alcune peculiarità legate alle reazioni avverse e alla tossicità:

1. Nei carnivori, a causa dell'ambiente gastrico acido ($\text{pH} \sim 2$), i t-FANS si presentano nella forma indissociata liposolubile che consente loro un rapido superamento delle membrane delle cellule epiteliali che rivestono la mucosa gastrica. Con la successiva dissociazione del farmaco a livello cellulare ($\text{pK} 7.0\text{-}7.4$) e la conseguente forma ionizzata meno liposolubile in cui si trova, il farmaco abbandona lentamente la cellula per raggiungere il torrente circolatorio. Si verifica così un progressivo accumulo intracellulare (intrappolamento ionico) e conseguente inibizione completa dell'attività cicloossigenasica di tali cellule. Ciò spiega la sensibilità dei carnivori e l'eventuale azione lesiva dei t-FANS sullo stomaco e alla porzione prossimale del duodeno. Una parziale soluzione a questo problema può essere la somministrazione a stomaco pieno.
2. L'emivita che è molto variabile tra un farmaco e un altro, può prolungarsi ulteriormente nel caso in cui l'eliminazione avvenga per via biliare con un

ricircolo enteroepatico come descritto prima per il cane in seguito a somministrazione di alcuni t-FANS. Questo comporta un prolungamento all'esposizione della mucosa enterica al farmaco, la cui azione lesiva viene ad essere in tal modo esaltata.

3. Poiché l'acido acetilsalicilico ed il paracetamolo vanno incontro a glucuronoconiugazione ed il gatto ha un tipico deficit di glicuroniltransferasi, l'enzima che catalizza tale reazione, il paracetamolo è assolutamente controindicato in questa specie. Sempre nel gatto, a causa della rallentata emivita di eliminazione, si prevede un allungamento dell'intervallo tra le somministrazioni di aspirina. Per le altre specie basta rispettare la posologia consigliata (Zizzadoro e Belloli, 2009).

1.2.3 FANS specifici nel cavallo

ACIDO ACETIL-SALICILICO:

l'acidoacetil-salicilico, meglio conosciuto come Aspirina®, è il farmaco antinfiammatorio non steroideo conosciuto da più tempo in medicina veterinaria ed esplica il proprio effetto tramite l'inibizione sia della COX-1 che della COX-2. Questo principio attivo è disponibile in molteplici formulazioni, ciò nonostante quella per uso orale risulta essere la più utilizzata nella pratica clinica in quanto l'ambiente acido dello stomaco ne favorisce l'assorbimento. Nel cavallo il tempo di emivita dell'aspirina è molto breve; alcuni studi hanno dimostrato che questo farmaco, somministrato EV al dosaggio di 19 mg/kg, ha un tempo di emivita che si aggira intorno ai 7 minuti (Lees et al., 1987). Durante la fase di assorbimento, in seguito a somministrazione orale, l'aspirina® è parzialmente idrolizzata ad acido salicilico e distribuita uniformemente in tutto l'organismo, con il raggiungimento di concentrazioni maggiori a livello epatico, cardiaco, polmonare e renale. Il metabolismo del farmaco avviene prevalentemente a livello epatico (coniugazione con glicina e acido glucuronico). Per quanto riguarda l'escrezione, i salicilati ed i loro metaboliti sono rapidamente eliminati con le urine per mezzo sia della filtrazione glomerulare che dell'escrezione tubulare attiva; quest'ultima è strettamente legata al pH delle urine. Nonostante la sua rapida clearance l'acido acetil-salicilico è un buon antitrombotico ed anche a bassi dosaggi può determinare un prolungamento significativo del tempo di sanguinamento. Alcuni studi eseguiti paragonando l'efficacia di tale proprietà utilizzando acido acetil-salicilico, fenilbutazone e flunixin meglumine, hanno confermato la spiccata proprietà di questo principio attivo nello svolgere la sua attività antitrombotica tramite l'inibizione del TXB-A₂, impedendo quindi la successiva aggregazione piastrinica (Kopp et al., 1985). L'aspirina® somministrata per OS al dosaggio di 12 mg/kg è in grado di esplicitare la sua attività antitrombotica per circa 48 ore. Il prolungamento del tempo di sanguinamento è inoltre dose dipendente, pertanto cavalli trattati con dosaggi elevati mantengono valori elevati del tempo di sanguinamento per un numero maggiore di ore (Cambridge et al., 1991). Questo particolare è motivato dal fatto che il legame che si ha tra l'acido acetil-salicilico e le COX è di tipo irreversibile, pertanto impedisce alle

piastrine di produrre nuova COX. Questo farmaco è somministrato nel cavallo anche per la sua attività analgesica ed antinfiammatoria, in questo caso il dosaggio è notevolmente elevato (10/100 mg/kg), ma a causa del tempo di emivita relativamente breve il suo impiego è molto raro nella pratica clinica (Tobin, 1979). Il maggiore utilizzo risulta pertanto essere quello della terapia antitrombotica, per questo motivo viene solitamente prescritto a dosaggi poco elevati (circa 17 mg/kg) e somministrato giornalmente. Il suo impiego quale farmaco antitrombotico è valido anche nel trattamento di altre patologie quali la laminite e la CID (coagulazione intravasale disseminata).

FENILBUTAZONE:

questo FANS è il più utilizzato in assoluto nella specie equina, per questo motivo risulta essere uno dei farmaci maggiormente studiati. Ampiamente utilizzato nel cavallo per il trattamento di molte patologie dell'apparato muscolo-scheletrico, può essere utile anche nel trattamento di fenomeni dolorifici acuti come la colica; è disponibile sia in formulazioni per uso endovenoso che per uso orale. In seguito alla sua somministrazione orale il fenilbutazone risulta essere ben assorbito ma il picco di concentrazione plasmatica viene raggiunto in tempi maggiori rispetto alla somministrazione endovenosa. Dopo l'assorbimento le maggiori concentrazioni del farmaco si hanno a livello epatico, cardiaco, renale, polmonare e plasmatico (Soma et al., 1983). Nel cavallo il tempo di emivita del fenilbutazone in seguito a somministrazione endovenosa è compreso fra le 3 e le 8 ore. Il tempo di emivita plasmatica in ogni soggetto dipende dalla dose di farmaco somministrato e dalla capacità metabolica del soggetto stesso. Nel puledro è maggiore che nell'adulto e compreso tra le 6 e le 22 ore (Wilcke et al., 1993). Il legame con le proteine plasmatiche risulta essere ottimo, raggiungendo una percentuale di circa il 99%. Il fenilbutazone nel cavallo viene metabolizzato principalmente a livello epatico dove si forma l'oxifenbutazone, un metabolita attivo che ha la caratteristica di essere escreto più lentamente dal corpo rispetto al suo precursore. Generalmente meno del 2% del farmaco viene escreto immodificato con le urine. L'efficacia terapeutica di questo principio attivo supera le 24 ore grazie al legame irreversibile con le COX, alla sua lenta eliminazione dai tessuti infiammati ed al prolungato tempo di emivita

dell'oxifenbutazone (Tobin et al., 1986); per questo motivo dosaggi elevati o somministrazioni ravvicinate sfociano frequentemente in un incremento sproporzionato delle concentrazioni plasmatiche del farmaco che possono provocare reazioni di tossicità. Queste ultime sono riferibili più comunemente ad ulcerazioni dell'apparato gastro-intestinale accompagnate da enteropatie proteino-disperdente, leucopenica,ipoproteinemia ed anemia (Gunson e Soma, 1983; Hough et al., 1999; Hun et al., 1985. La necrosi delle papille renali è un'altra delle complicazioni più frequenti, dovuta sia all'inibizione da parte del farmaco delle prostaglandine che regolano il flusso ematico renale, che alla diretta tossicità del fenilbutazone e dei suoi metaboliti (Read et al., 1983).

ACIDO MECLOFENAMICO:

è un derivato dell'acido antranilico che viene solitamente somministrato in formulazioni granulari nel trattamento di patologie dell'apparato muscoloscheletrico del cavallo. La sua farmacocinetica è stata in passato ben approfondita per quanto riguarda la specie equina. Il tempo di emivita è compreso tra 0,7 e 1,4 ore quando somministrato per via endovenosa (Snow et al., 1981; Johansson et al., 1991), ma può raggiungere le 2,6 ore se somministrato per via orale (Snow et al., 1981; Johansson et al., 1991). Il suo assorbimento dopo somministrazione orale è compreso tra il 60% e il 90%, con un picco plasmatico che solitamente è raggiunto tra la prima e la terza ora successive alla somministrazione (Johansson et al., 1991). Il legame alle proteine plasmatiche è elevato, circa il 98,9% (Galbraith e McKellar., 1996). Ad oggi non è ancora stata approfondita l'influenza che può avere l'alimentazione nei confronti della somministrazione del farmaco, se vi siano cioè delle differenze di assorbimento tra cavalli trattati con il FANS dopo essere stati cibati oppure senza essere stati cibati. Uno studio eseguito su alcuni ponies non ha evidenziato differenze significative circa l'assorbimento del farmaco in animali cibati e non cibati (Snow et al., 1981). Nella specie equina questo farmaco viene metabolizzato al livello epatico tramite una ossidazione e convertito in un idrossimetil-metabolita attivo che a sua volta è ossidato e convertito ad un carbossi-metabolita inattivo (Plumb., 1999). Non accumulandosi nei tessuti, trova applicazione nella pratica clinica per il trattamento di fenomeni infiammatori di tipo cronico (Conner et al., 1973). L'indice terapeutico di

questo principio attivo nel cavallo non è ad oggi ancora ben chiaro; uno studio eseguito su alcuni ponies trattati con acido meclofenamico per 10 giorni al dosaggio di 2,2 mg/kg ha evidenziato un abbassamento del valore delle proteine plasmatiche senza però rilevare altri effetti collaterali (May e Lees, 1999); un altro studio eseguito su alcune cavalle riproduttrici ed alcuni stalloni, utilizzando sempre il dosaggio di 2,2 mg/kg e trattandoli per più di cinque mesi, non ha invece evidenziato alcun effetto avverso sulla salute degli animali (Lees e Higgins, 1985). Numerosi studi eseguiti sul cavallo hanno comunque confermato l'efficacia di questo farmaco circa il suo effetto antinfiammatorio se utilizzato alla dose di 2,2 mg/kg. (Tobin 1979; Johansson et al., 1991; Galbraith e McKellar 1996).

È conosciuto per il suo lento *onset*, compreso tra le 36 e le 96 ore di terapia prima che i suoi effetti clinici risultino apprezzabili (Boothe, 1995). Ulteriori studi hanno messo in evidenza la particolare efficacia di questo farmaco nel trattamento della laminite sia acuta che cronica, tuttavia la sua maggiore validità rispetto agli altri Fans, nel trattamento di questa patologia, non è ad oggi ancora confermata da sufficienti studi (Lees e Higgins, 1985). Fenomeni di tossicità quali ulcerazioni dell'apparato gastro-intestinale, anoressia, depressione ed edema, sono noti solo in seguito a somministrazione di farmaco a dosi 6/8 volte superiori a quelle riportate in letteratura (Lees et al., 1985-93).

FLUNIXIN MEGLUMINE:

è un derivato dell'acido nicotinico disponibile in formulazioni sia per uso orale che parenterale ed è comunemente utilizzato come analgesico per il trattamento del dolore acuto che, nel cavallo, è frequentemente causato da coliche, coliti, endotossemia, malattie respiratorie, chirurgie generali, laminite (Lees e Higgins, 1985). La sua efficacia si dimostra ottima nel trattamento del dolore acuto viscerale con attività del tutto sovrapponibile a quella degli oppioidi, rispetto ai quali è comunemente preferito nella pratica clinica poiché presenta un numero ridotto di controindicazioni, quali l'eccitazione del SNC e l'ileo paralitico da diminuita motilità intestinale, tipicamente presenti invece nel trattamento con oppioidi (Boothe, 1995). Occorre però prestare particolare attenzione nel suo utilizzo durante il trattamento delle coliche chirurgiche in quanto un dosaggio elevato del farmaco può mascherare

la sintomatologia dolorifica e portare ad un'errata diagnosi (Lees e Higgins., 1985). Questo principio attivo risulta rapidamente assorbito anche quando utilizzato in formulazione orale, con il raggiungimento del picco plasmatico in 30 minuti ed una biodisponibilità dell'86% (Soma et al., 1988; Coakley et al., 1999; Semrad et al 1985). Se somministrato alla dose raccomandata di 1,1 mg/kg il flunixin meglumine ha un tempo di emivita di circa 1,5 – 3 ore, che si può prolungare fino alle 16 ore nel caso vi sia la presenza di essudato infiammatorio (Landoni e Lees, 1995; Soma et al., 1988). Il tempo di emivita di questo farmaco nel puledro è maggiore che nel cavallo adulto ed è generalmente di 5 ore (Semrad et al., 1993), tuttavia già dal secondo mese di vita del puledro il tempo di emivita plasmatico del farmaco tende ad uniformarsi con quello del cavallo adulto e ad essere compreso tra le 2 e le 3 ore (Landoni e Lees, 1995; Soma et al., 1988). Questa differenza sopra riportata potrebbe essere giustificata dal fatto che la clearance totale del puledro (29 ml /h per kg) è circa un terzo di quella dell'adulto (92 mg/h per kg) ed il volume di distribuzione del farmaco è maggiore nel puledro (223 mg/kg) rispetto che nell'adulto (145 mg/kg) (Soma et al., 1988; Semrad et al., 1993). Questo giustifica il fatto che il flunixin meglumine sia escreto più lentamente nel puledro rispetto che nell'adulto e che nel puledro vi sia un volume di distribuzione maggiore.

Non è stato rilevato nessun effetto avverso in puledri sani trattati con questo farmaco al dosaggio previsto per i cavalli adulti e corrispondente al valore di 1,1 mg/kg. Episodi di lievi ulcerazioni gastriche si sono manifestati soltanto in seguito a trattamento con dosaggio sei volte superiore a quello indicato in letteratura (Semrad et al., 1993). Non è ancora stato accertato l'effetto sulla farmacocinetica del flunixin meglumine nel caso il puledro trattato sia affetto oltre che dal processo infiammatorio anche da ulteriori patologie concomitanti. Per questo motivo, considerando il maggiore volume di distribuzione e la riduzione della clearance del farmaco, nei puledri neonati è consigliabile utilizzare le dosi riportate in etichetta e soprattutto non aumentare né il numero di somministrazioni giornaliere né il dosaggio del farmaco. La farmacocinetica di questo Fans può risultare alterata anche nel caso di cavalli anziani, uno studio eseguito su cavalli di età superiore ai 9 anni ha messo in evidenza un valore del tempo di emivita plasmatico di 4 ore, circa il doppio rispetto alle 2 ore dei cavalli giovani. Anche la clearance totale del farmaco risulta diminuita, con valore di circa 25

l/h per quanto riguarda i cavalli anziani e 40 l/h per i cavalli giovani (Jensen et al., 1990).

L'onset dell'effetto antiinfiammatorio avviene circa 2 ore dopo la somministrazione del farmaco, il picco della risposta tra le 12 e le 16 ore e la durata d'azione si prolunga fino alle 36 ore (Lees, Higgins., 1985). L'effetto analgesico ha un *onset* più rapido ma una durata più breve. La biodisponibilità del farmaco somministrato per via orale è ritenuta valida e paragonabile a quella delle formulazioni ad uso parenterale. Questa affermazione è supportata da uno studio che ha dimostrato come il flunixin meglumine in formulazione granulare, somministrato per os tramite una sonda nasogastrica, ha una biodisponibilità di circa l'85,8% (Soma et al., 1988). Un ulteriore studio eseguito su pony, cibati prima della somministrazione del farmaco sotto forma di pasta per uso orale (1,1 mg/kg), ha evidenziato un picco plasmatico con concentrazione del farmaco superiore ai 2 µg/kg già un'ora dopo la somministrazione (Welsh et al., 1992). Tra le formulazioni parenterali vi è quella intra muscolare, questa può in alcuni casi provocare fenomeni di necrosi dei tessuti molli nel sito d'inoculo (Kahn e Styrt, 1997); per questo motivo si consiglia di porre particolare attenzione alla asepsi durante la preparazione del farmaco da somministrare per via parenterale nonché alla adeguata disinfezione del sito d'inoculo. Il flunixin meglumine è considerato nel cavallo un Fans migliore e con indice terapeutico più ampio rispetto al fenilbutazone, ciò nonostante è necessario porre attenzione nell'impostazione del piano terapeutico con questo farmaco che, se somministrato a dosaggi troppo elevati, può causare la comparsa di ulcere gastriche (MacAllister et al., 1993). Nel cavallo la farmacodinamica di questo principio attivo è stata studiata approfonditamente ed è possibile affermare che si tratta di un buon Fans se utilizzato attenendosi ai dosaggi riportati in letteratura. In caso di infiammazione acuta il flunixin meglumine è in grado di inibire il TXB₂ sierico per più di 24 ore, la produzione di PGE₂ per più di 36 ore ed il gonfiore causato dal rilascio di bradichinine per circa 25 ore (Landoni e Lees, 1999). Lo studio della farmacocinetica e della farmacodinamica per il flunixin meglumine è stato eseguito inducendo un prototipo di artrite carpale successivamente trattato con il farmaco; lo studio ha evidenziato come cavalli trattati con 0,5 mg/kg di principio attivo non manifestavano nessun effetto antinfiammatorio significativo, il quale invece appare ottimale somministrando la dose di 1 mg/kg.

Inoltre l'aumento del dosaggio del farmaco non determina un miglioramento dell'effetto antinfiammatorio ma bensì un prolungamento del tempo di azione del farmaco, stimato di circa 16 ore con un dosaggio di 1 mg/kg e di 24 ore con un dosaggio di 2 mg/kg (Toutain et al., 1994).

CARPROFEN:

è un derivato dell'acido propionico ed è un Fans che possiede un buon effetto analgesico ma anche un buon effetto antinfiammatorio. Nel cavallo la forma (s+) ha una clearance più rapida ed un volume di distribuzione di 0,29 L/kg. Al contrario di molti altri fans usati nel cavallo, il carprofen al dosaggio consigliato di 0,7 mg/kg ha un tempo di emivita maggiore, con una durata compresa tra le 14 e le 31 ore (McKellar et al., 1991; Lees et al., 1994). Nonostante la lenta clearance, non ci sono segni di accumulo del farmaco nel plasma quando somministrato SID per OS per 15 giorni (McKellar et al., 1991). La biodisponibilità del carprofen somministrato per OS è buona ed è circa il 70%. È un farmaco abbastanza sicuro per quanto riguarda il suo dosaggio, studi effettuati somministrando cinque volte la dose consigliata in vena e due volte la dose consigliata per OS non hanno evidenziato la comparsa di alcun effetto collaterale del farmaco. La somministrazione intra-muscolare del farmaco ha invece determinato in alcuni casi l'aumento della creatin-chinasi sinonimo di danno cellulare muscolare, pertanto sarebbero necessari ulteriori studi per valutare la reale sicurezza circa la somministrazione di questo principio attivo IM nel cavallo. In diversi studi di laboratorio è stato accertato come questo principio attivo abbia un affetto analgesico solo quando la sintomatologia dolorifica è associata ad infiammazione (Strub et al., 1982). Inoltre il carprofen si accumula nell'essudato infiammatorio ma determina solo una modesta inibizione degli eicosanoidi se paragonato ad altri FANS quali il flunixin meglumine ed il fenilbutazone (Armstrong et al., 1999; Lees et al., 1994). I classici effetti collaterali causati dai fans, come ad esempio le ulcere gastro-intestinali, non sono comunemente osservati dopo trattamento con carprofen nel cane.

KETOPROFEN:

è un derivato dell'acido propionico disponibile nel cavallo in formulazioni parenterali per uso endovenoso ed intramuscolare. In passato sono state studiate anche formulazioni per uso orale ed endorettale ma la loro biodisponibilità dopo somministrazione è risultata insufficiente per poterle utilizzare nella pratica clinica (Corveleyn et al., 1996; Landoni e Lees., 1995). Si lega per il 92,8% alle proteine plasmatiche (Sams et al., 1995) ed ha un tempo di emivita breve, circa 1 ora per l'enantiomero R e 1,5 ore per l'enantiomero S (Landoni e Lees, 1995).

Viene metabolizzato per il 75% al livello epatico mentre il restante 25% viene escreto immodificato con le urine (Sams et al 1995). L'enantiomero S è associato ad attività tossica ed antiprostaglandinica, al contrario l'enantiomero R è responsabile dell'analgesia e non provoca reazioni avverse nel paziente (Landoni e Lees., 1996; Landoni et al., 1996). Si accumula nell'essudato infiammatorio nel quale permane circa 20-23 ore. Il massimo effetto antinfiammatorio si ha 4 ore dopo la somministrazione del farmaco e si mantiene per circa 24 ore, a dimostrazione del fatto non è legato alla sua concentrazione plasmatica ((Landoni e Lees., 1996). Questo farmaco può essere utilizzato anche nel puledro, per avere una buona efficacia è però necessario somministrare un dosaggio di farmaco iniziale più elevato che nell'adulto ed aumentare il numero delle somministrazioni poiché il tempo di eliminazione plasmatica del farmaco è maggiore che nell'adulto (Wilcke et al., 1998). Studi circa la tossicità del ketoprofene hanno evidenziato una sua maggiore sicurezza se confrontato ad altri FANS quali fenilbutazone e flunixin-meglumina (MacAllister et al., 1993). Può causare la comparsa di ulcere gastrointestinali ma questa evenienza è piuttosto rara se il farmaco è somministrato alla dose terapeutica consigliata.

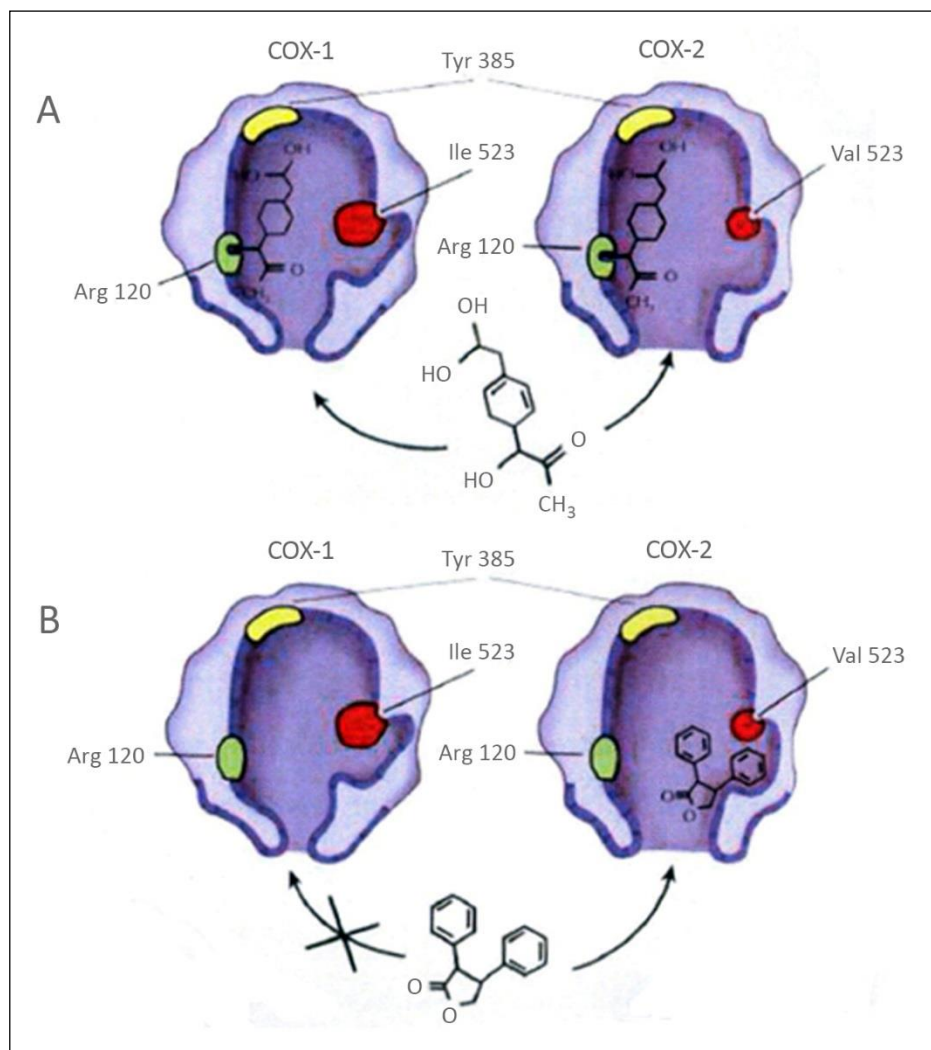
1.3 I COXIBs

I farmaci inibitori selettivi delle COX-2 sono chimicamente affini ed appartengono alla classe chimica dei cosiddetti COXIBs. La denominazione COXIB sta ad indicare una specifica classe chimica di composti (caratterizzati da una peculiare struttura molecolare contenente un anello triciclico ed un gruppo metilsolfonico) e non una selettività verso le COX-2, come spesso viene impropriamente usato in letteratura. I capostipiti degli inibitori della COX-2 sono il celecoxib ed il rofecoxib. Numerose altre molecole si sono in seguito aggiunte (inibitori della COX-2 di seconda generazione), come l'eterocoxib, il lumeracoxib, il robenacoxib, sviluppato per il trattamento del cane e del gatto, il valdecoxib e il suo pro-farmaco parecoxib che si distinguono per una selettività sempre più alta verso le COX-2, caratteristiche farmacologiche più favorevoli e/o minori effetti collaterali (Zizzadoro e Belloli, 2009). Infatti, l'inibizione selettiva delle COX-2 è stata proposta già dopo i primi studi, per la terapia anti-infiammatoria e analgesica, risparmiando il deleterio effetto gastrointestinale (GI), come l'ulcera peptica, associati all'inibizione delle COX-1 (Needleman e Isakson, 1997). Studi clinici hanno dimostrato che i farmaci COX-2 selettivi provocano una riduzione importante del dolore e del gonfiore alle articolazioni, con una bassa incidenza statisticamente significativa di ulcere gastriche (Simon et al., 1998, Isakson et al., 1998).

- Le basi molecolari della selettività risiedono (Zizzadoro e Belloli, 2009):
- Nell'assenza dei gruppi funzionali metilsolfonico e solfonamidico, capaci di interagire con residui aminoacidici localizzati in corrispondenza della tasca laterale del canale cicloossigenasico, accessibile solo nella COX-2.
- Nell'assenza del gruppo carbossilico (-COOH), che impedisce alla molecola di avere un sito di ancoraggio sull'Arg-120, riducendo la capacità di legame della molecola alla COX-1.
- Nell'ingombro sterico, che rende difficoltoso l'ingresso della molecola nello stretto canale cicloossigenasico delle COX-1 (**Figure 6-8**).

Nonostante i COXIBs si leghino inizialmente ad entrambe le isoforme in maniera reversibile, l'ampia catena laterale dei COXIBs provoca la formazione di un complesso stabile con il canale idrofobico della COX-2 provocando un ritardo nella rottura di tale legame e l'aumento sia della potenza che dell'inibizione verso tale isoforma (Chavez e DeKorte, 2003).

Figura 8 Basi molecolari della selettività dei FANS inibitori delle COX-2. A) I t-FANS hanno accesso al canale cicloossigenasico di entrambe le isoforme dove possono legarsi al residuo Arg120. B) I FANS selettivi della COX-2 legano i residui aminoacidici presenti nella tasca laterale mediante i loro gruppi funzionali metilsolfonico e sulfonamidico, non legano l'Arg120 per presenza del gruppo -COOH, non hanno accesso alla tasca laterale delle COX-1 ostruita dal voluminoso residuo aminoacidico Ile523 e sono caratterizzati da un ingombro sterico che ostacola il loro ingresso nel canale cicloossigenasico della COX-1, più stretto di quello della COX-2 [Zizzadoro e Belloli, 2009].



Il vantaggio principale (se paragonato ai t-FANS) ad oggi noto nell'ambito del dolore acuto perioperatorio, è la preservazione della funzione piastrinica e cioè il mantenimento della normale coagulazione (Langford e Mehta, 2006). Un altro vantaggio importante associato ai COXIBs è il miglior profilo di sicurezza (sempre rispetto ai t-FANS) per quanto riguarda l'apparato gastro-enterico (Hinz et al., 2007).

1.3.1 COXIBs di prima generazione

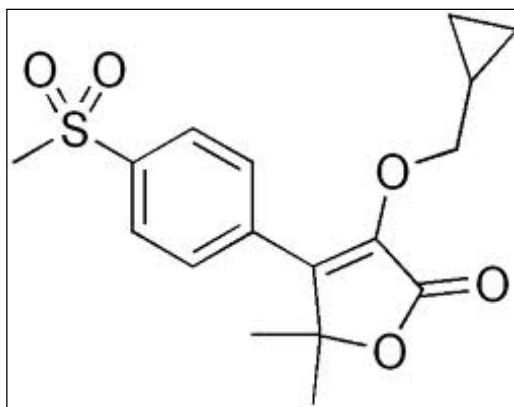
Fanno parte di questa categoria farmaci come il celecoxib e il rofecoxib. (Walter H. Hsu and Arthi Kanthasamay., 2004). Questi farmaci sono ormai stati sorpassati dall'uso dei COXIBs di seconda generazione a cui questa tesi fa riferimento, pertanto verranno meglio trattati e spiegati. Questi COXIBs non sono stati registrati per la medicina veterinaria.

1.3.2 COXIBs di seconda generazione (ad uso veterinario)

Verranno trattati in questa tesi gli inibitori selettivi della COX-2 di ultima generazione: firocoxib, daracoxib, mavacoxib, robenacoxib e cimicoxib. Sono tutti farmaci approvati per il trattamento dell'infiammazione nel cane, mentre solo il firocoxib anche per il trattamento del cavallo (Equioxx[®], pasta orale, Merial, Sanofi, Francia).

1.3.2.1 Firocoxib

Figura 9 Firocoxib



Il firocoxib, 3-(ciclopropilmetoxi)-4-(4-(metilsolfonil)fenil)-5,5-dimetilfuranone (**Figura 9**) è il primo COXIB ad essere stato approvato dall'EMA (nel 2004) per il trattamento dell'infiammazione nel cane (uso orale), e nel 2008 è stato esteso l'utilizzo anche per il cavallo (sia orale che in soluzione iniettabile); nel 2006 è stato approvato anche dalla FDA come primo COXIB indicato per il cavallo (uso orale). È commercializzato dalla Merial (Francia) con i nomi commerciali di Previcox® e Equioxx®, rispettivamente per il cane ed il cavallo. I dosaggi indicati per questo farmaco sono specie dipendenti, con la dose raccomandata di 0.1 mg/kg/die per il cavallo per un massimo di 14 giorni e di 5 mg/kg/die per il cane. Il firocoxib, nella sua forma di impasto (cavallo) o compresse masticabili (cane) è usato per il controllo del dolore e dell'infiammazione associati a DJD (degenerative joint disease) (Kvaternick et al., 2007). Nel cane, inoltre, è indicato per il controllo del dolore post-operatorio. Nel 2010 Merial Limited ha annunciato l'introduzione negli USA di Equioxx® in soluzione iniettabile (IV) con la stessa indicazione terapeutica sopra descritta (Anonymous 2010b).

Da studi clinici il firocoxib è risultato altamente efficace ed accettabile per il controllo del dolore e dell'infiammazione associato ad osteoartriti nei cani (Hanson et al., 2006; Pollmeier et al., 2006; Ryan et al., 2006). Cani con una sinovite sperimentalmente indotta trattati con firocoxib hanno dimostrato una zoppia significativamente ridotta rispetto agli stessi trattati con carprofene (McCann et al., 2004).

Alla somministrazione orale della dose raccomandata il firocoxib mostra le seguenti caratteristiche farmacologiche (Anonymous, 2006; Anonymous, 2007):

- **Biodisponibilità assoluta:**
nel Cavallo è di ~ 79%
nel Cane è di ~ 38%
- **C_{max} e T_{max} :**
Cavallo: C_{max} di 0.8 µg/ml raggiunta dopo 4 ore dalla somministrazione (T_{max})
(in alcuni soggetti anche fino a 12 ore).
Cane: C_{max} di 1.3 µg/ml con una T_{max} di 1 ora (questi valori si alterano con la co-somministrazione di cibo rispettivamente a 0.9 µg/ml e 5 ore senza cambiare la biodisponibilità).
- **Legame con proteine plasmatiche:**
Cavallo = ~ 98%
Cane = ~ 96%

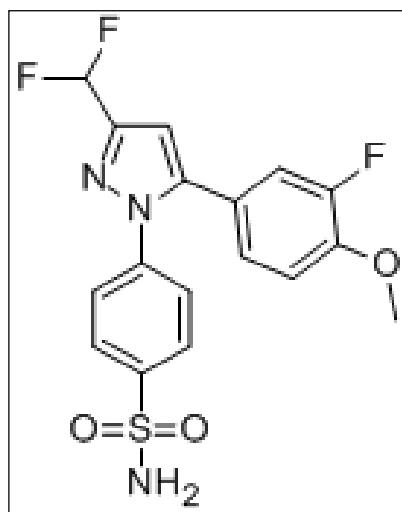
Nonostante questa alta percentuale il volume di distribuzione in entrambi i casi risulta ampio (cavallo = $V_d(ss)$ ~ 1.652 mL/kg; Cane = $V_d\lambda$ ~ 4.6 L/kg).

- **Tempo di emivita terminale ($t_{1/2}$):**
Nel cavallo, dopo la somministrazione IV, risulta di 30-40 ore con un conseguente accumulo (se la dose è ripetuta) ed il raggiungimento alla concentrazione plasmatica stabilizzata dopo 6-8 ore dalla somministrazione orale del dosaggio giornaliero. Nel cane è di 7.8 ore.
- **Metabolismo ed eliminazione:** il meccanismo metabolico principale del firocoxib è la deciclopropilmetilazione dando origine al metabolita deciclopropilmetilfirocoxib. Di seguito si forma il glucuronide coniugato. Entrambi i metaboliti hanno un'attività farmacologica bassa o nulla (Kvaternick et al., 2007).

Analisi farmacodinamiche in condizioni di laboratorio controllate di uno studio di sei cani trattati con la dose terapeutica di firocoxib non hanno rivelato nessun effetto avverso in termini di vomito, anoressia, letargia, debolezza, dolori addominali, ematochezia, profilo emocitocromico ed ulcere (Steagall et al., 2007).

1.3.2.2 Deracoxib

Figura 10 Deracoxib



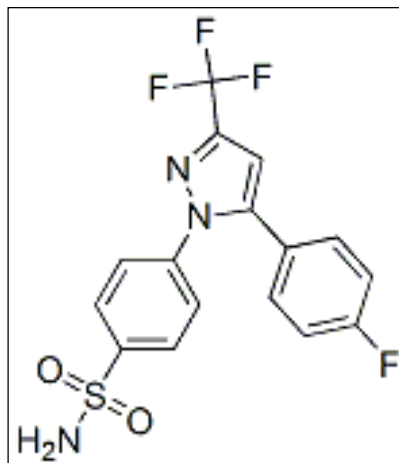
4-[5-(3-difluoro-4-metoxifenil)-(difluorometil)-1H-pirazole-1-il] benzensulfamide (**Figura 10**) è un inibitore selettivo facente parte dei COXIBs. È il primo (nel 2002) approvato negli USA ed è indicato solo per i cani, per la riduzione del dolore e dell'infiammazione associati ad interventi chirurgici ortopedici e per il trattamento sintomatico (dolore cronico e la conseguente zoppia) del DJD. È commercializzato da Novartis Animal Health US, Inc. con il nome di Deramaxx[®] ed è disponibile nella forma farmaceutica di compresse masticabili per uso orale.

Il deracoxib ha un assorbimento orale rapido. È legato alle proteine plasmatiche per il >90%. A livello epatico viene metabolizzato in 4 metaboliti principali. La quasi totalità del deracoxib è escreto attraverso le feci come molecola madre pura oppure come metabolita O-demetilato [Anonymous, 2005].

Il $t_{1/2}$ del deracoxib nel cane alla dose di 2-3 mg/kg è di 3 ore. Tale valore è minore da quanto mostrato per il gatto (7.9 ore alla dose di 1 mg/kg) (Gassel et al., 2006) e tanto minore da quanto riportato da uno studio su 6 cavalli (12.49 ± 1.84 ore con 2 mg/kg).

1.3.2.3 Mavacoxib

Figura 11 Mavacoxib

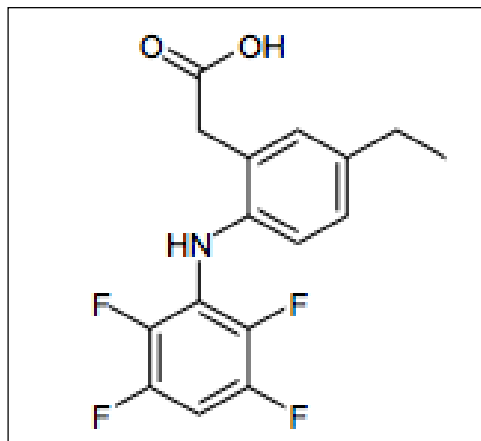


4-[5-(4-fluorofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] benzenesulfonamide (**Figura 11**) è inibitore delle COX-2 autorizzato dall' EMEA nel 2008 (non è disponibile negli USA), è commercializzato da Pfizer Limited con il nome Trocoxil®. È disponibile solo per uso orale in compresse di dosaggio variabile (6, 20, 30, 75 e 95 mg), indicato ai cani di età > 1 anno che soffrono di dolore e infiammazione associati a DJD e che necessitano di un trattamento continuo di oltre un mese.

Le caratteristiche farmacocinetiche di questo farmaco sono simili a quelle descritte per i due precedenti con una differenza importante che riguarda la clearance e il $t_{1/2}$. La clearance è relativamente bassa (2.7 mL/h/kg) e il $t_{1/2}$ è evidentemente prolungato con un intervallo di 8-39 giorni (media ~ 17 giorni) in cani giovani (Cox et al., 2010). In cani di età media di 9 anni il $t_{1/2}$ raggiunge un valore medio di 39 giorni e in una piccola parte di questa popolazione (<5%), un valore medio di oltre 80%; il motivo di questo fenomeno è tutt'oggi oscuro. Questo fattore permette la somministrazione di mavacoxib in un protocollo di una compressa al mese (nel primo mese una ripetuta a distanza di 14 giorni dopo la dose iniziale) che rappresenta un vantaggio per quanto riguarda la *compliance* da parte dei proprietari. Somministrazione di mavacoxib che corrisponde il dosaggio mensile raccomandato fino a un periodo di 6.5 mesi ha prodotto un miglioramento della zoppia e della qualità della vita dei cani studiati (Anonymous, 2011b).

1.3.2.4 Robenacoxib

Figura 12 Robenacoxib



Il robenacoxib, 2-[5-etil-2-(2,3,5,6-tetrafluoroanilino)fenil]acetic acid (Figura 12) è un nuovo farmaco, membro del gruppo COXIB [King et al., 2009], sviluppato esclusivamente per uso veterinario. Il robenacoxib è stato autorizzato all'immissione in commercio in Europa a Dicembre 2008 ed è commercializzato da Novartis Animal Health UK Ltd sotto il nome di Onsior®, ed è indicato anche per il gatto. Di recente (Marzo 2011) è stato il primo COXIB approvato per gli USA anche nel gatto. Le forme farmaceutiche disponibili sono sia come compressa ad uso orale sia come soluzione iniettabile. Le compresse sono indicate per il trattamento del dolore e dell'infiammazione associati ad DJD cronica nei cani e per il trattamento del dolore acuto e dell'infiammazione associati a disordini muscolo scheletrici nei gatti. La soluzione iniettabile è indicata per il trattamento del dolore e dell'infiammazione associati a chirurgia ortopedica nei cani o dei tessuti molli nel cane e nel gatto (Anonymous, 2010c).

Strutturalmente il robenacoxib è simile al diclofenac un inibitore preferenziale delle COX-2 (Voltaren®, dalla quale deriva) e al lumiracoxib inibitore più selettivo (in vitro) delle COX-2 (Tacconelli et al., 2002; Esser et al., 2005). La struttura del robenacoxib e del lumiracoxib differisce dagli altri inibitori selettivi per la COX-2 per il gruppo contenente l'acido carbossilico in questi due COXIBs, invece che la porzione solfonica presente negli altri (Esser et al., 2005; King et al., 2009).

Il profilo farmacocinetico del robenacoxib è stato sviluppato e largamente studiato da Jung et al. (2008) in cani ai quali è stato somministrato 1 mg/kg di robenacoxib attraverso le vie IV, SC e orale (in cani sia nutriti che a digiuno). Il farmaco si è dimostrato ben tollerato in tutti gli animali e attraverso tutte le vie di somministrazione e non sono stati riscontrati effetti avversi.

I risultati indicano alcune proprietà favorevoli come il breve tempo impiegato per raggiungere la C_{max} e l'alta disponibilità dopo entrambe le vie, sottocutanea e orale a digiuno. La co-somministrazione di robenacoxib per via orale insieme al cibo riduce del 26% la biodisponibilità ma senza evidente alterazione della C_{max} e/o del T_{max} [Jung et al., 2008]. I dati da studi ex vivo indicano che il robenacoxib ha una durata d'azione relativamente breve nel compartimento centrale, allorché l'inibizione delle PgE_2 al campionamento a 6 ore è risultata da debole a nulla. Al contrario la durata dell'efficacia clinica è presunta essere significativamente più lunga, in quanto il robenacoxib si concentra e si accumula con un conseguente aumento del tempo di resistenza nell'essudato infiammatorio [King et al., 2009]. Il legame del robenacoxib alle proteine plasmatiche è >98% sia nei cani che nei gatti, ciò indica che è presente quasi esclusivamente nel plasma con relativamente poca penetrazione nei tessuti. Inoltre, il livello del legame con le proteine plasmatiche non è concentrazione-dipendente, quindi la farmacocinetica del robenacoxib non dovrebbe provocare delle variazioni importanti in soggetti affetti da ipoproteinemia [Jung et al., 2008].

Lo studio eseguito da King et al., (2010) che ha comparato alcune caratteristiche farmacodinamiche di alcuni FANS ad uso veterinario vs il robenacoxib riporta i seguenti risultati:

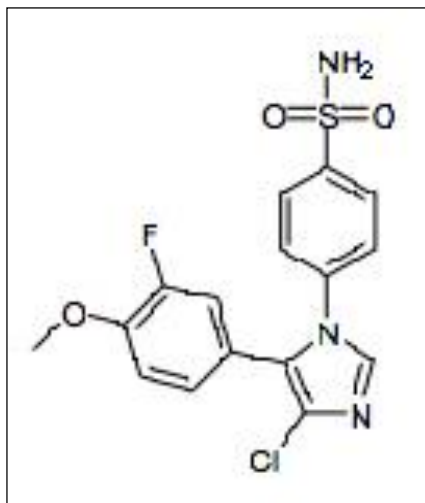
- la selettività del robenacoxib è risultata la più alta fra tutti i FANS comparati come segue: COX-1/COX-2 IC_{50} = robenacoxib (128.8) > daracoxib (48.5) > nimesulide (29.2) > S+ carprofen (17.6) > meloxicam (7.3) > etodolac (6.6) R-carprofen (5.8) > ketoprofene (0.88);
- fatta eccezione per l'interposizione tra etodolac e meloxicam, è risultato lo stesso ordine del punto precedente per i rapporti di inibizione IC_{80} ;
- per gli otto farmaci è stato calcolato il grado di potenza per l'inibizione del TxA_2 sierico (indice per l'inibizione della COX-1). L'ordine della potenza è

stato: ketoprofene > meloxicam > nimesulide > etodolac > deracoxib > robenacoxib > S+ carprofen > R-carprofen;

- analogamente è stato calcolato il grado della potenza per l'inibizione della PgE_2 plasmatica (indicativo per l'inibizione della COX-2): robenacoxib > ketoprofene > meloxicam > deracoxib > nimesulide > etodolac > S+ carprofen > R-carprofen;
- infine è stato calcolato anche il rapporto $\text{IC}_{20} \text{TxA}_2 : \text{IC}_{80} \text{PgE}_2$. Questo rapporto fornisce un utile indicatore della selettività, perché durante l'uso clinico per assicurare l'efficacia è generalmente considerato appropriato il raggiungimento alla concentrazione IC_{80} della COX-2 che non quella dell' IC_{50} . Inoltre è desiderata una concentrazione che non superi l' IC_{20} della COX-1, per assicurare effetti collaterali minimi in relazione al tratto GI e dell'omeostasi (Giraudel et al., 2005; Giraudel et al., 2009). Fra i farmaci esaminati nel suddetto studio il rapporto più alto è stato quello del robenacoxib (19.8), quello più basso del ketoprofene [King et al., 2010].

1.3.2.5 Cimicoxib

Figura 13 Cimicoxib



Il cimicoxib (CX) 4-[4cloro-5-(3-fluoro-4-metossifenil)-1H-imidazol-1-il] benzenesolfonamide (**Figura 13**) è un inibitore selettivo COX-2, commercializzato dal Febbraio 2011 dalla Vetoquinol SA (Francia), con il nome di Cimalgex® ed è disponibile in compresse masticabili alla dose di 8, 30 e 80 mg. La dose consigliata per il trattamento è 2 mg/kg (Anonymous, 2009). Originariamente sviluppato per trattare la depressione e la schizofrenia, questo composto ha mostrato una buona attività quando testato sia in modelli sperimentali di infiammazione che contro dolore acuto e cronico (Haroon et al., 2012). Dopo alcuni anni di studi clinici umani, sulle sue proprietà anti-infiammatorie e analgesiche, è stato reindirizzato dal settore umano al settore veterinario.

Sono pochi gli studi su questo composto sia per quanto riguarda la farmacodinamica che la farmacocinetica.

Dopo somministrazione orale nel cane a digiuno al dosaggio raccomandato di 2 mg/kg, il CX è rapidamente assorbito e il tempo per raggiungere la massima concentrazione (T_{max}) è di 2.25 (± 1.24) ore. Il picco della concentrazione (C_{max}) è 0.3918 (± 0.09021) $\mu\text{g/ml}$, l'area sotto la curva (AUC) è 1.676 (± 0.4735) $\mu\text{g h/ml}$ e la biodisponibilità orale è 44.53% (± 10.26) (Anonymous, 2009). Dati leggermente

differenti sono stati riscontrati da Sorbera e Ramis [2004]; la biodisponibilità dopo somministrazione orale di 1 mg/kg è stata del 75% con T_{max} di 2h e $t_{1/2}$ di 7 ore. In vivo, in modello con dolore acuto, 10 h dopo la somministrazione (2 mg/kg), le concentrazioni plasmatiche sono state riscontrate sopra i 100 ng/mL (i valori EC_{50}/IC_{50} variavano tra 216 e 452 ng/mL). A 24 h le concentrazioni sono risultate inferiori ai valori indicati di EC_{50}/IC_{50} in tutti gli animali. Considerando le differenze di stima di biodisponibilità e la correzione per la farmacocinetica non lineare, è emerso che l'effetto del CX è stato di circa 10-14 ore [Anonymous, 2009].

Vista la recente immissione sul mercato del CX i pochi studi comparativi presenti in letteratura riguardano il suo confronto con altri COXIBs già largamente utilizzati in terapia veterinaria.

In 248 cani sottoposti ad interventi chirurgici (articolari e dei tessuti molli) trattati con carprofene e CX, l'analgesia prodotta dal CX non è risultata inferiore a quella del carprofene sia nelle 24 h successive post intervento sia nel periodo di follow-up (da 16 a 168 h post intervento). Dato significativo è risultato l'inadeguata analgesia dove solo il gruppo dei cani trattati con carprofene (123 cani) ha dato tre casi rispetto al nessun caso del gruppo trattato con CX (114 cani). Circa un terzo degli animali di entrambi i gruppi ha manifestato almeno un effetto avverso (gastrointestinale, epatico, renale e cardiovascolare) (Grandemange et al., 2013).

Inoltre, il confronto tra il CX e il firocoxib ha confermato che CX riduce zoppia, dolore, disturbi del sistema locomotore ed edema nei cani con osteoartrite cronica durante i 90 giorni di follow-up dello studio (Anonymous, 2009).

Negli esseri umani subisce una reazione di demetilazione e una coniugazione (glucuronide coniugato); il metabolita demetilato è inattivo sia verso i COX-1 che i COX-2. Nei ratti, dopo somministrazione orale e intravenosa, l'escrezione biliare risulta essere la principale via di eliminazione. Nel cane, dopo somministrazione orale, il farmaco è stato ampiamente metabolizzato, meno dello 0.2% è risultato immutato. Il 70 e il 30% della dose è stata escreta rispettivamente nelle feci e nelle urine (Sorbera e Ramis, 2004).

Per quanto riguarda la tossicità riproduttiva sui conigli, il CX colpisce la fertilità e lo sviluppo fetale. Non ci sono studi su cagne gravide quindi se ne sconsiglia l'uso in

gravidanza [Anonymous, 2009]. In uno studio di tolleranza di 26 settimane è stato dimostrato che si verificano effetti avversi sia sul tratto gastrointestinale sia, in minor misura, sul rene (necrosi papillare) alla dose non terapeutica di 10 mg/kg. Non ci sono stati danni significativi alla dose terapeutica di 2 mg/kg (Kim e Giorgi, 2013).

Il CX è stato somministrato anche in cani Beagle (n=12) e nello stesso protocollo in uno studio pilota in cani (n=40) di diverse razze, peso e sesso, ai quali è stata indotta infiammazione tramite iniezione di caolino. Successivamente alla somministrazione del CX è stata valutata la riduzione del dolore. E' stato postulato che, oltre all'effetto antiinfiammatorio del CX, possa essere coinvolto anche un effetto non associato alla sua attività di FANS (quale quello oppioide). Questo fa sì che esso potrebbe essere utilizzato anche nel trattamento del dolore acuto. (Jeunesse et al., 2013). Sempre nello stesso studio, il CX è stato somministrato anche per via IV per valutarne il polimorfismo, e si è visto che ci sono due tipi di metabolizzatori: metabolizzatori lenti e metabolizzatori veloci. Ciò può essere dovuto al polimorfismo del citocromo P450 2D15 (cyt. P2D15) nei cani. A prescindere dalle variabilità nei valori di Tmax e Cmax si è assunto che la dose ottimale di CX (PO) è di 2 mg/Kg. (Jeunesse et al., 2013).

Uno studio più recente è stato condotto su due gruppi di cani sani, di razza Beagle (n=6) e Labrador (n=6). I primi sono stati trattati con un dosaggio di CX 2 mg/Kg ed i secondi, con un peso corporeo di ca. 40 Kg, con una compressa di Cimalgex® (Vetoquinol, 80 mg) (corrispondente ad un dosaggio compreso tra 1.95 e 2.5 mg/kg). Non sono state osservate significative differenze in termini di Tmax e Cmax, a prescindere dalla variabilità nella dose, e nel peso e razza dei cani. Se ne è concluso che il dosaggio ottimale del CX per il trattamento dell'infiammazione nel cane è di 2 mg/Kg. [Kim et al., 2014].

1.3.3 CIMICOXIB: stato dell'arte in medicina veterinaria

In considerazione della recente immissione in commercio di questo principio attivo, pochi studi sono stati ad oggi eseguiti. Risultano completamente assenti studi in merito alla sua farmacocinetica e farmacodinamica nel cavallo. Uno studio preclinico è stato condotto su ratti per valutare l'effetto antischizofrenico del Cx nell'uomo. E' emerso che il CX aveva un buon effetto analgesico nel trattamento del dolore acuto articolare indotto sperimentalmente (Almansa C. et al., 2004). In seguito a questa scoperta, il principio attivo è stato studiato anche in medicina veterinaria ed approvato come antinfiammatorio/analgesico nella specie canina.

Nello studio clinico eseguito da (Grandemange et al., 2013) sono state valutate efficacia e sicurezza del cimicoxib quando impiegato nel trattamento del dolore post-operatorio nel cane. Lo studio è stato eseguito su 237 cani sottoposti ad interventi di chirurgia ortopedica o dei tessuti molli. In particolare l'efficacia del cimicoxib è stata paragonata a quella di un altro fans, il carprofen. Il 50% della popolazione canina presa in esame è stata trattata con cimicoxib al dosaggio di 2 mg/kg, mentre l'altro 50% con carprofen al dosaggio di 4 mg/kg. Il cimicoxib è stato somministrato sotto forma di compresse masticabili per uso orale due ore prima della chirurgia e successivamente ad intervalli di 24 ore per due giorni, con possibilità di estendere il trattamento ad altri 4 giorni a discrezione del veterinario e nei casi necessari per il trattamento del dolore post-operatorio residuo. Il carprofen è stato somministrato in un'unica iniezione 2 ore prima della chirurgia e successivamente per via orale in 5 somministrazioni ad intervalli di 24 ore. Il dolore è stato valutato da medici veterinari nei 7 giorni successivi all'intervento chirurgico tramite l'utilizzo di due sistemi di valutazione del dolore a punteggio ed una scala di valutazione visiva. Lo studio è stato infine completato con la valutazione del dolore anche da parte dei proprietari dei cani in quanto persone maggiormente a contatto con l'animale e quindi più indicate per rilevare variazioni delle normali abitudini del soggetto in studio. Tutte le valutazioni del dolore sono state eseguite in doppio cieco. Al termine dello studio è emerso come non sussista una differenza significativa tra i due farmaci utilizzati, confermando quindi il buon effetto analgesico del cimicoxib se paragonato ad un fans ormai noto come estremamente efficace nel trattamento del dolore post-operatorio dopo

interventi di chirurgia ortopedica e dei tessuti molli. Durante lo studio inoltre, non si sono evidenziate manifestazioni avverse al farmaco, confermando la sua sicurezza quando utilizzato nei dosaggi e nei tempi riportati in etichetta.

Lo studio sperimentale di (Juenesse et al., 2013) ha avuto lo scopo di determinare il corretto dosaggio del cimicoxib nel trattamento di un fenomeno infiammatorio caolino-indotto sull'arto anteriore degli animali in studio. I cani (di sono stati inizialmente trattati con cimicoxib per via orale al dosaggio di 2 mg/kg ed è stata verificata la farmacocinetica. I risultati hanno messo in evidenza la presenza di due gruppi di cani: metabolizzatori lenti e veloci. E' stata valutata la farmacocinetica anche dopo somministrazione per via endovenosa al medesimo dosaggio e con risultati sovrapponibili alla prova con somministrazione orale. A tal punto sono stati stabiliti degli *endpoints* ai quali far riferimento per poter valutare i classici effetti terapeutici (analgesico, antipiretico ed antinfiammatorio) dei FANS. I risultati ottenuti, dopo l'induzione dell'effetto infiammatorio, hanno evidenziato come non sussistessero differenze significative circa l'effetto massimo e la durata dell'effetto massimo nei due gruppi di cani, mentre differenze significative si avevano circa la durata totale dell'effetto terapeutico. È stato infine eseguito un ulteriore studio nel quale i 12 cani, sempre sottoposti a stimolo infiammatorio caolino-indotto, sono stati collocati su una piattaforma in vetro e stimolati al livello dell'arto infiammato per mezzo di raggi IR. Si è valutato in tal caso, la velocità di reazione del soggetto in risposta allo stimolo termico algico. Per poter valutare questo aspetto è stato considerato 100, il valore di analgesia massima che un soggetto può avere fisiologicamente. È stata quindi paragonata la risposta dei cani trattati con cimicoxib alla risposta dei cani sempre sottoposti ad infiammazione indotta, ma non trattati. I risultati dello studio hanno evidenziato come cani non trattati abbiano una soglia di analgesia prossima allo zero e pertanto una velocità di reazione allo stimolo algico estremamente rapida, mentre i cani trattati con il FANS hanno una risposta allo stimolo algico molto più lenta ed una soglia di analgesia maggiore di quella degli animali sani. Quest'ultimo risultato ha permesso di ipotizzare un effetto simil-oppioide del cimicoxib.

(Kim et al., 2013) hanno determinato le caratteristiche farmacocinetiche del CX in cani sani dopo un'unica somministrazione orale di principio attivo seguendo 2

protocolli. Nel primo sono stati impiegati 5 cani Beagle mantenuti a digiuno, ai quali è stato somministrato il farmaco per via orale al dosaggio di 2 mg/kg. Nel secondo protocollo sono, invece, stati impiegati 6 cani Labrador retriever, a digiuno e non, ai quali è stata somministrata un'unica compressa masticabile contenente 80 mg di principio attivo (per un dosaggio stimato di 1,95- 2,5 mg/kg) utilizzando uno studio a crossover. I risultati di questo studio sperimentale non hanno evidenziato differenze sostanziali di farmacocinetica dopo somministrazione di CX alla dose di 2 mg/kg o ad una dose approssimativa, compresa tra 1,95 e 2,5 mg/kg (compressa masticabile da 80 mg), confermando quindi la versatilità del farmaco nella pratica clinica anche nei casi in cui il dosaggio utilizzato non corrisponda strettamente a quello riportato in etichetta. Lo studio, inoltre, ha evidenziato che la farmacocinetica del farmaco non è influenzata dalla ripienezza dello stomaco, supportando ulteriormente la maneggevolezza e la versatilità di questo FANS.

2. Scopo della tesi

Lo scopo della corrente tesi è stato quello di determinare la farmacocinetica del cimicoxib in asini e cavalli dopo somministrazione orale di Cimalgex® al dosaggio di 2 e 5 mg/kg e di valutarne la sua selettività sugli enzimi ciclossigenasici nei cavalli al dosaggio maggiore.

3. Materiali e metodi

3.1 Sperimentazione animale e in laboratorio

La sperimentazione è stata effettuata presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa. Lo studio è stato suddiviso in tre fasi:

- Sperimentazione animale;
- Analisi dei risultati;
- Integrazione dei risultati.

3.1.1 Sperimentazione animale

La sperimentazione è stata approvata dal Comitato Etico per il benessere degli animali dell'Università di Pisa (n° protocollo 001 4896/2013).

3.1.1.1. Animali

Gli animali inclusi nello studio sono asini di razza Amiatina (n=6) e cavalli di razza Trotter (n=6), femmine, di età diverse. Successivamente la sperimentazione si è svolta su un numero di 5 cavalle a causa dell'impossibilità di gestione di una di esse ed all'impossibilità di utilizzo di sedativi al fine di non falsare i risultati dello studio. Le cavalle, di razza Trottatore Italiano, di età compresa tra i 9 e gli 11 anni, avevano un peso corporeo compreso tra i 434 ed i 577 Kg, mentre le asine, di razza Amiata, di età compresa tra i 7 ed i 9 anni, avevano un peso corporeo compreso tra i 250 ed i 324 Kg.

3.1.1.2. Gestione animali

Sia le cavalle che le asine erano alloggiate in paddocks multipli di dimensioni 30 x 40 m. L'alimentazione era a base di fieno polifita somministrato *ad libitum* e circa 2,5 kg di concentrati somministrati la mattina. Tutti i soggetti erano sottoposti a profilassi vaccinale per influenza equina, tetano ed herpesvirus e trattati per parassitosi gastro-intestinali (ivermectina, 0,2 mg/kg PO) secondo le linee guida dell'American Association of Equine Practitioners Infectious Disease Committee (Available at: http://www.aaep.org/vaccination_guidelines.htm. Accessed April 10, 2010).

3.1.1.3 Protocollo sperimentale

Il protocollo animale è stato basato sulla teoria del quadrato latino 2x2 con un disegno *cross-over*, a due fasi, singolo trattamento e singola dose, tramite il quale gli animali trattati sono stati suddivisi in due gruppi (n=2, n=3 per le cavalle; n=3, n=3 per le asine) in maniera del tutto casuale, in modo da ridurre al minimo gli errori derivanti da fattori esterni alla sperimentazione stessa. Gli animali destinati a ricevere la somministrazione del farmaco senza essere cibati sono stati collocati in box con lettiera in truciolo (in modo tale da evitare qualsiasi tipo di alimentazione) 12 ore prima della sperimentazione, lasciando loro a disposizione soltanto l'acqua d'abbeverata. Il primo giorno di sperimentazione gli animali sono stati trattati con CX al dosaggio di 2 mg/Kg secondo lo schema:

SPECIE	CIBATE	NON CIBATE
CAVALLE	N° = 3	N° = 2
ASINE	N° = 3	N° = 3

La sperimentazione si è svolta nel seguente modo:

- 1) **Pesa degli animali:** l'animale è stato pesato con bilancia fissa al fine di eseguire un corretto calcolo della dose di farmaco da somministrare.
- 2) **Inserimento catetere endovenoso:** l'inserimento del catetere endovenoso (14G, Terumo®, Giappone) è stato necessario per poter eseguire i prelievi ematici in maniera rapida e senza arrecare danno ai vasi (il rischio di flebiti aumenta significativamente nei cavalli in cui si effettuano molteplici prelievi su uno stesso vaso ed in tempi ravvicinati). Per l'applicazione del catetere è stata realizzata una tricotomia di circa 10 x 5 cm in senso longitudinale, del terzo medio del collo a livello della doccia giugulare. Quindi è stato preparato un

campo chirurgico nella regione di applicazione del catetere alternando tre passaggi con povidone ioduro a tre passaggi con alcool etilico. Il catetere endovenoso è stato inserito in direzione prossimo-distale formando un angolo di circa 30°-40° con la cute, portandolo successivamente in posizione parallela al vaso una volta certi di essere all'interno della vena giugulare. Il corretto posizionamento è stato accertato dall'arrivo del sangue in prossimità del tampone apicale del catetere. La punta del mandrino è stata quindi retratta all'interno del catetere e si è completato l'inserimento della cannula. Il mandrino metallico è stato rimosso ed il catetere chiuso per mezzo di un tappino perforabile. Infine per evitare spostamenti del catetere in fase di prelievo, si è provveduto al fissaggio di quest'ultimo mediante l'apposizione di due punti di sutura rispettivamente a destra ed a sinistra della porzione sporgente dello stesso.

- 3) **Pulizia catetere endovenoso:** la pulizia del catetere è necessaria per preservarne la pervietà. Quindi prima e dopo ogni prelievo ematico sono stati infusi circa 2 mL di soluzione salina contenente eparina (10 UI/ml) in modo da impedire la formazione di coaguli in prossimità del catetere endovenoso. Per questo motivo, onde evitare interferenze con gli studi farmacologici, da ogni prelievo sono stati scartati i primi 2 mL di sangue.
- 4) **Inserimento sonda naso-gastrica:** è importante impiegare una sonda che sia adeguata alla mole del soggetto, infatti l'utilizzo di una sonda di diametro troppo grande in animali di dimensioni ridotte provoca spesso lesioni del setto nasale e successivi traumatismi, associati ad abbondante sanguinamento a causa della ricca vascolarizzazione della regione interessata. Anche l'utilizzo di una sonda di diametro ridotto non è raccomandato in quanto aderendo poco alle strutture che incontra durante il proprio passaggio, è spesso causa di errore ed inserimento in trachea anziché in esofago (Frank G. R. Taylor et al., 2010). Per i motivi sopra elencati abbiamo utilizzato una sonda per equini adulti per le cavalle ed una sonda per puledri nelle asine. Tutti gli animali sono stati contenuti soltanto con l'applicazione del torcinaso al fini di preservare il riflesso di deglutizione necessario per applicare la sonda e di non interferire con il protocollo sperimentale. La sonda è stata lubrificata prima del suo

inserimento in modo da non generare attrito durante il passaggio attraverso il meato ventrale della narice ed evitare dolorabilità e sanguinamento della mucosa. L'ingresso nel suddetto meato è stato assicurato applicando una pressione con le dita in direzione ventrale e mediale, indispensabile al fine escludere l'ingresso nel meato medio con possibilità di danneggiamento degli etmo-turbinati od addirittura nel meato dorsale che conduce alla "falsa narice" ed impedisce qualsiasi avanzamento. L'inserimento della sonda è stato agevolato tramite sollevamento della cartilagine alare della narice scelta per il sondaggio, ponendo attenzione a non ostruire accidentalmente la narice controlaterale, questa evenienza causerebbe nel cavallo una sensazione di soffocamento con inevitabile agitazione ed impossibilità di introduzione della sonda. Una volta giunti in prossimità della faringe il cavallo ha manifestato delle deglutizioni a vuoto, a tal punto è stata eseguita una manovra definita di "incappucciamento" avente lo scopo di flettere la testa del cavallo ventralmente e favorire l'esposizione della apertura faringea dell'esofago. Quindi con dei movimenti alternati sia progressivi che regressivi si è favorito la deglutizione ed il passaggio della sonda in esofago. Questo passaggio riveste un'importanza cruciale poiché fondamentale per esser certi che la sonda sia posizionata in esofago e non in trachea; evenienza confermata nel caso in cui la progressione della sonda sia visibile al livello del solco giugulare sinistro verso l'entrata del petto, che dalla sonda siano udibili dei crepitii e fuoriesca un odore acido tipico dello stomaco ed infine che si abbia una certa resistenza nel progredire, resistenza spesso assente o molto lieve quando si è in trachea.

- 5) **Trattamento farmacologico:** il CX è stato somministrato mediante sonda naso-gastrica alla dose di 2 e 5 mg/kg con un periodo di wash-out di 15 giorni. Nelle cavalle, in considerazione delle dimensioni della sonda naso-gastrica, è stato possibile somministrare le compresse senza disgregarle; mentre nelle asine, a causa delle dimensioni ridotte della sonda e dell'impossibilità di passaggio delle stesse al suo interno, è stato necessario disgregare le compresse e somministrare il farmaco in sospensione in 200 mL di acqua distillata. Per facilitare il passaggio nello stomaco di tutto il farmaco presente

nella sonda, dopo ogni somministrazione si è favorito il suo deflusso con l'aggiunta di 500 mL di acqua distillata.

6) **Farmacocinetica:** sono stati eseguiti i prelievi al tempo zero e quindi ad intervalli di 5, 15, 30, 45 minuti, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 ore.

a. Per gli studi di farmacocinetica è stato eseguito anche un prelievo di liquido sinoviale:

- i. Per praticità e facilità di esecuzione si è scelto come sito di prelievo l'articolazione del carpo. E' stata eseguita una tricotomia della faccia dorsale del carpo, compresa tra l'articolazione radio-carpica prossimalmente e l'articolazione carpo-metacarpica distalmente.
- ii. L'esecuzione del campo operatorio è stata effettuata come descritto precedentemente per l'inserimento del catetere endovenoso, ma i passaggi di iodio povidone e alcool in questo caso sono stati fatti per un tempo minimo di 7 minuti e si sono protratti fino al momento del prelievo, preceduto da un ultimo passaggio con alcool e dall'attesa di alcuni istanti necessari a consentire l'evaporazione dello stesso dalla cute. Il prelievo è stato eseguito in modo asettico approccio dorsale. L'arto anteriore è stato flesso per facilitare la distensione dell'articolazione carpale e l'evidenziazione, tramite palpazione, dei recessi carpali mediale e laterale al tendine estensore comune delle falangi. Il prelievo è stato eseguito sul recesso carpale laterale penetrando per circa 2,5 cm in articolazione ed utilizzando un ago da 20G sprovvisto di siringa; questa infatti se presente può causare un "effetto leva" e danneggiare l'articolazione. La conferma del corretto reperimento della capsula sinoviale è stato confermato dalla fuoriuscita spontanea di liquido sinoviale dal cono dell'ago. E' stato quindi apposto al cono dell'ago una siringa da 2,5 mL ed è stato prelevato circa 1 mL di liquido sinoviale. Questa procedura è stata resa più facile dal massaggio dei tendini

flessori dell'arto anteriore durante l'esecuzione del prelievo. In alcuni casi è stato necessario un riposizionamento interno dell'ago in quanto l'aspirazione del liquido era impedita dall'apposizione di villi sinoviali o dal contatto dell'ago con la cartilagine articolare; evenienza quest'ultima da evitare per non causare lesioni alla cartilagine stessa (William et al., 2007). Nei casi in cui la capsula non è stata reperita al primo tentativo, si sono compiuti tentativi successivi di reperimento facendo particolare attenzione a non perforare nuovamente la cute. La ripetuta perforazione di quest'ultima e della capsula sono, infatti, la più frequente complicazione quando si impiega questa tecnica e possono portare in alcuni casi allo sviluppo di fenomeni infiammatori o, e nei casi più gravi, ad infezioni articolari.

7) Raccolta, trattamento e conservazione campione per analisi farmacocinetiche: dopo ogni prelievo il sangue è stato raccolto in provette contenenti litio-eparina (per gli studi farmacocinetici) e centrifugato per 10 min a 3500 g. Il plasma ottenuto è stato prelevato e conservato congelato a -20°C fino all'esecuzione delle analisi. Il liquido sinoviale è stato centrifugato immediatamente dopo la raccolta e congelato a -20 fino all'analisi.

Il liquido sinoviale è stato prelevato dopo 2 e 10 ore negli animali cibati e dopo 4 e 24 ore negli animali non cibati dopo la somministrazione del farmaco. I prelievi sono stati eseguiti alternativamente dal carpo destro e sinistro, al fine di non traumatizzare eccessivamente una singola articolazione a causa dei prelievi ripetuti.

7) Farmacodinamica: le analisi in questione sono state eseguite solo per la specie equina. I prelievi di sangue sono stati effettuati al tempo zero e ad intervalli di 1, 2, 4, 10 e 24 ore.

8) Raccolta, trattamento e conservazione campione per analisi farmacodinamiche:

Per gli studi farmacodinamici, i campioni di sangue sono stati raccolti in 2 tipi di provette:

- 1) provetta litio-eparina: il campione è stato utilizzato per lo studio delle prostaglandine (PGE2). In particolare, per il saggio delle PGE2 sono stati aggiunti 20 μ L di lipopolisaccaridi (LPS) al sangue in provetta con sodio eparina (2 mL) e incubati a 37°C per 24 ore per simulare la produzione delle PGE2 da parte delle cellule mononucleate. Inoltre è stato aggiunto tampone fosfato (PBS) al sangue eparinizzato per il controllo negativo. Dopo l'incubazione il sangue è stato centrifugato a 400 g per 10 minuti e 100 μ L di plasma sono stati uniti a 400 μ L di MeOH (metanolo) per precipitare le proteine ed è stato centrifugato a 400 g per 10 minuti a 37°C; il surnatante è stato prelevato e congelato a -80°C fino all'esecuzione delle analisi;
- 2) provetta in vetro senza anticoagulante: il campione è stato centrifugato per 10 min a 3500 g ed il siero ottenuto è stato conservato congelato a -20°C fino all'esecuzione delle analisi. Questo campione è stato utilizzato per lo studio dei trombossani (TBX).
- 3) Le analisi di TBX e PGE2 sono state eseguite con un kit ELISA validato per i cavalli (MyByoSource.com), seguendo le istruzioni fornite dal produttore con il kit stesso. I campioni sono poi stati diluiti rispettivamente 15 e 25 volte per TBX e PGE2, utilizzando i tamponi forniti con il kit.

3.1.2. Chimica e Reagenti

Il CX (purezza > 99.0 %) è stato fornito da Vetoquinol (Bertinoro, Italia). Il Parecoxib (PX) (purezza > 99.0%) è stato fornito da Pfizer (Groton, CT, USA). L'acetonitrile (ACN), il metanolo (MeOH), il diclorometano (CH_2Cl_2), l'etere dietilico (Et_2O), il cicloesano (C_6H_{12}), l'n-esano (C_6H_{14}), l'acido acetico (CH_3COOH) sono stati acquistati da Merck (Darmstadt, Germania). L'acido trifluoroacetico (CF_3COOH) di grado analitico è stato ottenuto da BDH (Poole, UK). Il cloruro di potassio (KCl), l'idrossido di sodio (NaOH) e l'acetato d'ammonio (AcONH_4) sono stati comprati da Carlo Erba (Milano, Italia). L'acqua deionizzata è stata prodotta da Milli-Q Millipore Water System (Millipore, MA, USA). Successivamente essa è stata bidistillata tramite un bidistillatore. Tutti gli altri reagenti e materiali di grado analitico sono stati forniti da comuni fonti commerciali. I componenti acquosi e organici della fase mobile, degassati sotto pressione, sono stati miscelati meccanicamente dall'HPLC. Le fasi mobili sono state filtrate mediante filtri membranosi di acetato di cellulosa 0.2 μm (Sartorius Stedim Biotech S.A. Aubagne Cedex, Francia) con un apparecchio per la filtrazione di solventi. Il medicinale Cimalgex[®] per il trattamento degli animali è stato gentilmente fornito da Vetoquinol (Bertinoro, Italia).

3.1.3 Soluzioni standard

Sono state preparate singole soluzioni madre di CX e PX. Ogni soluzione della concentrazione di 1000 µg/mL è stata preparata con matracci volumetrici e conservata a -20°C. Successivamente le soluzioni di CX e PX sono state diluite in provette di vetro (10 mL), per arrivare alla concentrazione finale di 10, 5, 1 µg/mL. Queste ultime sono state conservate a -20°C.

Successivamente sono state effettuate ulteriori diluizioni con metanolo a partire da soluzioni madre di 100 µg/mL, allo scopo di ottenere concentrazioni a 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25 µg/mL. Queste nuove concentrazioni, riguardanti specificatamente il CX, sono state aggiunte a campioni di plasma di cane, sono state analizzate attraverso l'HPLC in ordine di concentrazione crescente (per tre volte ciascuna). Al fine di ottenere una retta di taratura, i dati sono stati analizzati con il programma GraphPad Prism 4 Projeet versione 4.0, 2003.

3.1.4 Tampone e soluzioni per estrazione

- **Tamponi di acetato d'ammonio 10 mM a pH vari.**

I tamponi di AcONH_4 utilizzati per determinare parte della fase mobile e per l'estrazione, alla concentrazione di 0.01 M sono stati preparati pesando esattamente 0.77 g di AcONH_4 disciolti in un litro di acqua bidistillata milliQ sotto agitazione meccanica. La soluzione è stata portata a pH 3.0, 4.0, 4.6, 5.0, 6.0 aggiungendo gradualmente gocce di CH_3COOH e leggendo il pH in tempo reale tramite un pHmetro con elettrodo a vetro e sonda termica. I tamponi sono stati conservati in frigorifero a $+4^\circ\text{C}$.

Solventi Puri	Solventi in Miscela
Etere etilico 100%	N-esano/Etere etilico 30/70%
N-esano 100%	Etere etilico/Diclorometano 30/70% - 60/40% - 70/30%
Diclorometano 100%	

3.1.5 Strumentazione

- Centrifuga UNIVERSAL 320 Hettich universal 320;
(Ramsey, Minnesota, USA);
- Centrifuga pb international MinisSpin® plus per eppendorf
(Hamburg, Germany);
- Vortex VWR, VV3 (Lutterworth, England);
- Agitatore DYNAL Sample Mixer (Tilling Drive Stone, Staffordshire, UK);
- pHmetro, HANNA INSTRUMENTAL HI 9219 (Ronchi di Villafranca, PD, Italy);
- HPLC: high performance liquid chromatography, Jasco (Tokyo, Japan).

3.1.5.1 HPLC-FL

Per questo studio è stato usato uno strumento HPLC di tipo fluorimetrico dotato di una pompa HPLC Jasco PU-2089 con rivelatore fluorimetrico Jasco FP-2020 Plus.

La separazione del campione dall'analita CX e del suo standard interno è stata eseguita tramite colonna Kinetex C18 di lunghezza 100 mm e diametro 4.6 mm con dimensioni di particelle di 2.6 μm .

Le condizioni di lavoro dello strumento sono state determinate in accordo con lo studio Saccomanni et al. [2011] leggermente modificate.

Lo strumento ha lavorato secondo eluizioni sia in gradiente che in isocratiche con flusso di 1 mL/min, gain 1000 e detector impostato per lunghezza d'onda pari a λ 268 nm di eccitazione e λ di emissione 430 nm.

La fase mobile utilizzata è stata composta di due fasi A e B in rapporto di 35:65. La fase A è ACN, la fase B è composta dal tampone di AcONH_4 0.01 M sopra descritto (pH 4.6).

3.1.6 Validazione del metodo

Il metodo era già stato validato per il plasma canino nel precedente studio, quindi è stato brevemente rivalidato per il plasma equino.

- **Accuratezza:** è stata dimostrata iniettando il plasma di asini e cavalli non trattati farmacologicamente (bianco).
- **Variazione Intra-day e Inter-day:** è stata determinata effettuando analisi ripetute dei campioni di controllo qualità (CQ) nello stesso giorno e in giorni differenti.
- **Specificità del metodo:** è stata valutata confrontando i cromatogrammi ottenuti iniettando il bianco di plasma di cane non soggetto ad alcun trattamento farmacologico con quelli ottenuti iniettando il plasma nel quale sono stati aggiunti concentrazioni note di analiti e tenuti a 37° per 30 min (metodo delle aggiunte) e quelli ottenuti analizzando i campioni di plasma di cani soggetti a trattamento con CX.
- **LOD e LOQ:** la più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata ma non quantificata (LOD) e la più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata e quantificata (LOQ) sono state calcolate determinando il rapporto segnale-rumore ottenuto confrontando i segnali misurati su campioni contenenti concentrazioni note di CX con quelle di campioni bianchi. In particolare il valore di concentrazione corrispondente al segnale più basso misurabile sul campione con la certezza che questo segnale non possa essere scambiato per bianco dovuto al rumore di fondo (LOD) è stato calcolato nel modo seguente:
 - **LOD** (segnale): valore medio dei bianchi + 3 volte la deviazione standard dei bianchi. Il valore di concentrazione corrispondente al segnale misurabile sul campione a partire dal quale si può ragionevolmente cominciare a quantificare la concentrazione del campione stesso (LOQ) è stato calcolato nel modo seguente;
 - **LOQ** (segnale): valore medio dei bianchi + 10 volte la deviazione standard dei bianchi.
- **Linearità del metodo:** l'abilità di dare risultati che sono direttamente proporzionali alla concentrazione degli analiti nei campioni all'interno di un

determinato campo di validità. È stata dimostrata iniettando in HPLC-FL soluzioni dell'analita a sei concentrazioni note. Dall'area dei picchi corrispondenti è stata costruita una curva di calibrazione. La linearità è stata verificata attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione della curva di taratura seguita (R^2). Il range lineare è stato valutato determinando l'intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia linearmente con la concentrazione (area proporzionale della concentrazione).

3.1.7 Metodo per la determinazione delle concentrazioni di analita nei campioni

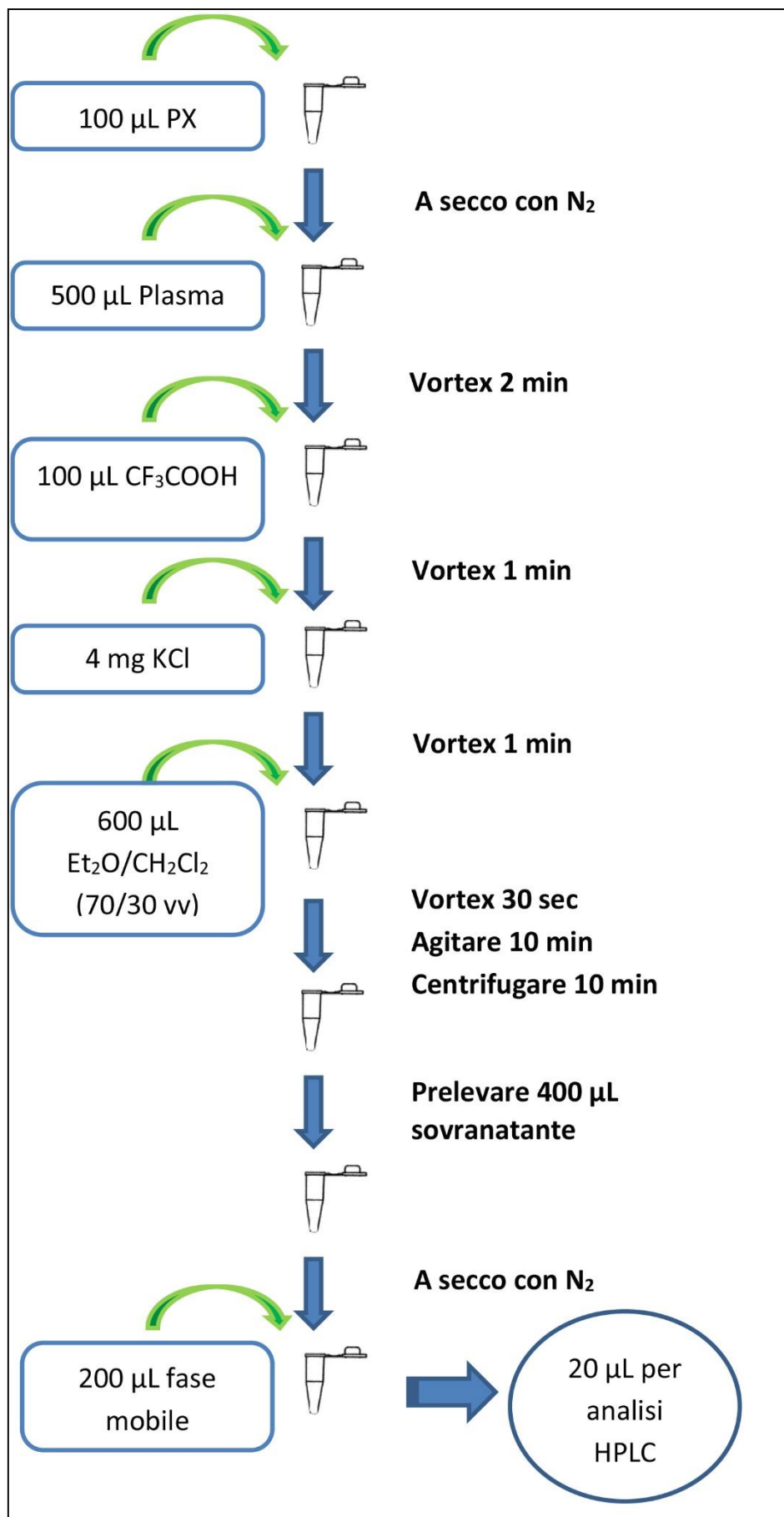
Per questo studio è stato utilizzato il metodo dello standard interno, PX, scelto per le affinità strutturali, chimico-fisiche e di solubilità nei riguardi della molecola utilizzata, giustificata in parte da una appartenenza alla medesima classe di farmaci.

Questo metodo è servito nel processo di estrazione del CX, dove la percentuale dello standard interno PX è risultata equivalente alla percentuale estratta di CX, ciò ha determinato la possibilità di calcolare il recupero dell'analita attraverso determinati passaggi matematici:

- Determinazione del rapporto tra l'area dello standard interno di ciascun campione e l'area della soluzione standard determinata per la costruzione della curva di taratura.
- Determinazione del picco corrispondente al totale recupero di PX, e quindi di CX, definito Real Area, attraverso il rapporto tra l'area dei picchi di CX ricavati per ciascun campione e la percentuale del recupero dello standard interno calcolato precedentemente.

3.1.8 Procedura di estrazione ottimizzata

La procedura di estrazione è stata effettuata in eppendorf di polipropilene da 2 mL. Sono stati introdotti nelle eppendorf 100 μ L di PX 10 μ g/mL e portate a secco sotto getto delicato di azoto. E' stato introdotto 1 mL di plasma e vortexato per 2 min. Sono stati aggiunti 100 μ L di CF_3COOH al 10% e dopo agitazione con vortex è stata introdotta una punta di spatola di KCl (circa 4 mg), e vortexati (15 sec). 600 μ L di miscela di estrazione (etere etilico/diclorometano 7:3 v/v) sono stati aggiunti alla soluzione e vortexati (30 sec), agitati (60 oscillazioni min, 10 min) e centrifugati a 21.913 g (raggio rotore 10 cm) per 10 min a 10°C. Sono stati prelevati 400 μ L di sovranatante e disposti in eppendorf pulite da 1.5 mL. Portati a secco con getto gentile di azoto ed il residuo è stato ripreso con 100 μ L di fase mobile e vortexati. Successivamente 20 μ L della soluzione ottenuta sono stati iniettati in HPLC per l'analisi. Lo schema dell'estrazione completa è riportato nello schema seguente:



3.1.9 Valutazione farmacocinetica ed analisi statistica

I calcoli farmacocinetici sono stati attuati utilizzando il software WinNonLin v 5.3.1 (Pharsingth Corp, Sunnyvale, CA, USA) in accordo ad un modello non-compartimentale. La concentrazione massima (C_{max}) di CX nel plasma e il tempo necessario per raggiungere il C_{max} (T_{max}) sono stati predetti dai dati. L'area sottesa alla curva (AUC_{0-24}) è stata calcolata seguendo la regola dei trapezi (Gibaldi e Perrier, 1982).

Sono state calcolate le seguenti variabili: la concentrazione massima (C_{max}), il tempo per la concentrazione massima (T_{max}), il tempo di emivita della fase terminale ($t_{1/2 \lambda z}$), costante di eliminazione nella parte terminale (λz), area sotto la curva della concentrazione plasmatica vs tempo, estrapolata nelle 24 ore (AUC_{0-24}) [Wagner, 1993], volume apparente di distribuzione (V_z/F), clearance plasmatica apparente (Cl/F), area sotto la curva al momento dell'ultima osservazione ($AUMC_{last}$), tempo medio di permanenza basato sui valori dell'ultima concentrazione misurata (MRT_{last}). Le analisi statistiche sono state valutate mediante il test Anova. I risultati sono stati presentati come valore medio \pm deviazione standard. Tutte le analisi sono state condotte usando GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc, La Jolla CA, USA). In tutte le indagini le differenze sono state considerate significative se il livello di probabilità associata (P) è stato minore di 0.05.

4. Risultati

4.1 Sviluppo del metodo analitico

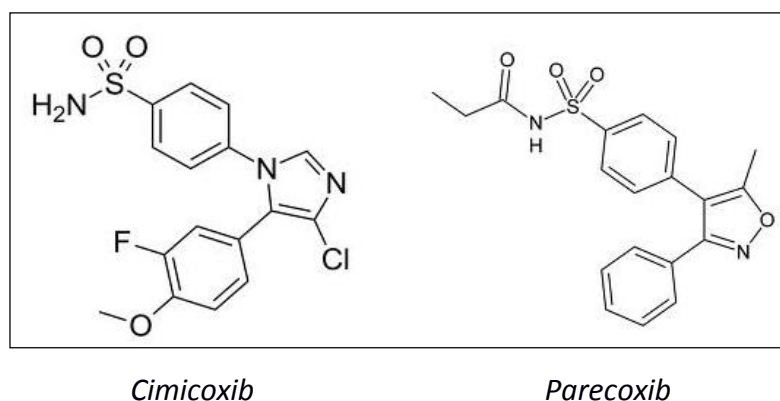
Al fine di ottimizzare la separazione cromatografica degli analiti il pH del tampone della fase mobile è stato variato (3.0, 4.0, 4.6, 5.0, 6.0). Essendo il CX non pH sensibile e il parecoxib (PX) pH sensibile, il cambio del pH ha permesso lo slittamento a tempi di ritenzione maggiori solamente del picco dello standard interno (PX). Ciò ha permesso di allontanare nettamente i due composti consentendo una corretta separazione dei picchi cromatografici.

Sono state valutate velocità di flusso differenti e comprese tra 0.3 – 1.2 mL/min, usando una colonna Kinetex C18 di lunghezza 100 mm e diametro 4.6 mm con dimensioni di particelle 2.6 μ m. La fase mobile finale è risultata ACN:AcONH₄ (10 mM) pH 4.6 (35:65) con un flusso di 1 mL/min. Le analisi sono state condotte sia in gradiente che in isocratica. Dopo analisi dei picchi cromatografici si è preferito l'utilizzo dell'isocratica che permette un'analisi più semplice ed evita i tempi di riequilibrio della colonna.

Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione sono state testate all'interno degli intervalli di 250-280 e 350-450 nm. Le lunghezze d'onda di λ 268 nm di eccitazione e λ di emissione 430 nm sono risultate essere le più adatte.

Come standard interno è stato utilizzato un composto avente caratteristiche chimico fisiche simili al CX: il PX. (**Figura 14**).

Figura 14 Struttura molecolare dello standard interno e del cimicoxib.



4.2 Ottimizzazione del metodo di estrazione

La deproteinizzazione del campione plasmatico è stata testata con diversi agenti: KCl 10%, NaCl 10% e CF_3COOH 10%. Il miglior risultato è stato ottenuto da acidi forti. Il CF_3COOH è risultato il migliore. In aggiunta per migliorare la precipitazione proteica ed eliminare l'interferenza del plasma nella lettura cromatografica sono stati aggiunti 4 mg di KCl al processo di estrazione. Questo ha permesso di aumentare la forza ionica della componente acquosa del campione.

Per quanto riguarda il solvente di estrazione sono stati testati differenti solventi organici e loro miscele. L'etere dietilico (Et_2O) ed il diclorometano (CH_2Cl_2) sono stati selezionati come solventi più idonei in termini di estrazione degli analiti e minimizzazione dei componenti della matrice (interferenze). Inoltre, sono state valutate, in termini di recupero e selettività, le variazioni delle proporzioni dei solventi d'estrazione prescelti ($\text{Et}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 3:7, 3:2, 7:3, v/v). Il $\text{Et}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (7:3 v/v) ha presentato il miglior recupero sia dell'analita (CX) ($76\pm5.6\%$) che dello standard interno (PX) ($69\pm8.6\%$).

Un altro aspetto ad essere valutato è stata l'influenza dei cicli di estrazione sull'efficienza dell'estrazione stessa. Il tempo di estrazione è stato fissato a 10 minuti ed il numero dei cicli è stato variato da uno a due. Il secondo ciclo ha determinato un aumento modesto del recupero ($83.2\pm12.3\%$), tale da non giustificare l'utilizzo di due cicli estrattivi.

4.3 Validazione del metodo

- **Linearità:** è stata raggiunta una buona linearità nell'intervallo investigato. L'equazione della retta di regressione lineare è riportata nella **Tabella 2**.
- **LOQ e LOD:** il LOQ è stato di 10 ng/mL, il Lod di 3 ng/mL (**Tabella 2**). L'esattezza e la precisione sono risultate nei criteri richiesti dall'EMA (RDS%, <20%) (Anonymous, 2009).
- **Esattezza:** l'esattezza è stata valutata attraverso la determinazione del recupero per cinque duplicati di ogni campione CQ. Il CV (%) è risultato di 5.8. Il valore di ripetibilità per l'analita, inter-day e intra-day, è stato calcolato tramite la quantificazione di CX in cinque campioni duplicati di CQ (rispettivamente 5 controlli in una giornata e 5 controlli in 5 giorni diversi). Gli errori relativi all'esattezza sia intra-day che inter-day sono risultati <7% (**Tabella 2**).

Tabella 2 Riassunto della validazione dei dati per il CX.

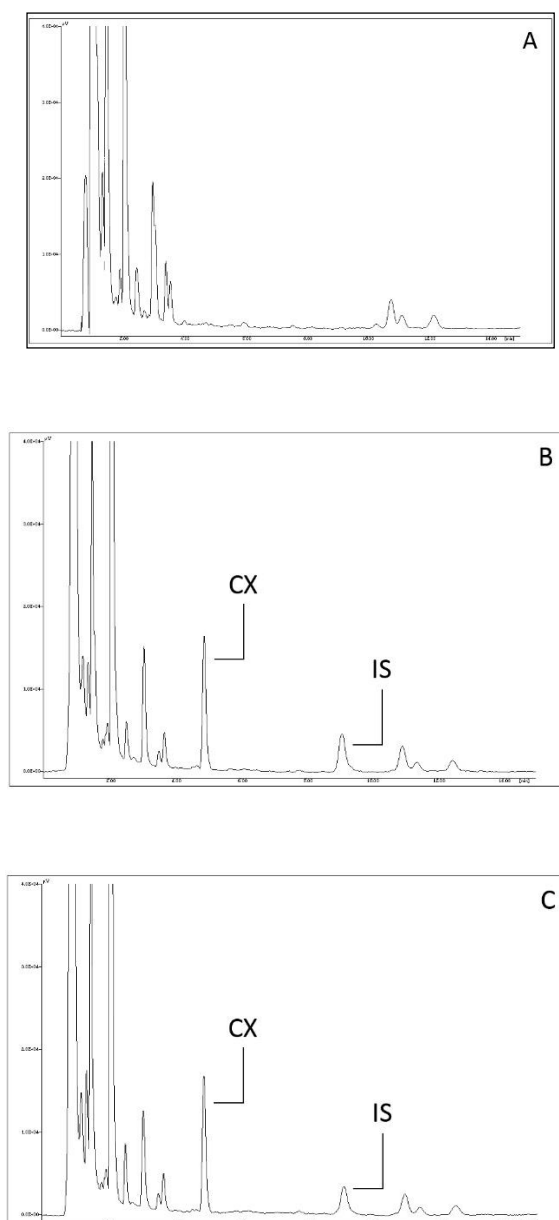
Proprietà	CX
Intervallo lineare (ng/mL)	10 – 2500
Equazione di calibrazione	$Y = 133x + 6803$
Coefficiente di correlazione (r^2)	0.9985 ± 0.0354
LOQ (ng/mL)	2,5
LOD (ng/mL)	0,8
Esattezza	98.9 ± 4.3
Precisione (%)	
Interday	1.3 – 42.9
Intraday	2.9 - 6.1
Specificità	Specifico

- **Ripetibilità:** allo scopo di valutare e assicurare la buona riproducibilità del metodo, sono stati eseguiti studi di stabilità. Sono state analizzate le soluzioni madre degli analiti, dell'IS (0.100 µg/mL), nonché i campioni di CQ (ad alta e bassa concentrazione). La stabilità a breve e lunga durata ha mostrato che gli

analiti sono stabili nel plasma equino (CV % <7). Questo risultato ha indicato che la conservazione a -20°C degli analiti nei campioni del plasma è congruo, e quindi, che non dovrebbero subentrare problematiche relative alla stabilità durante le analisi di routine per studi farmacocinetici.

- **Specificità:** la specificità del metodo è stata dimostrata dal confronto tra le curve cromatografiche della matrice di controllo (bianco), controllo con analiti aggiunti e matrice da cavalli trattati (Figura 15).

Figura 15 Tracciato cromatografico eseguito con HPLC-FL. **A:** Tracciato cromatografico di plasma di controllo (bianco); **B:** Tracciato cromatografico di plasma con aggiunta di CX e IS (100 ng/mL); **C:** Tracciato cromatografico di cavallo trattato (4h).



4.4 Farmacocinetica

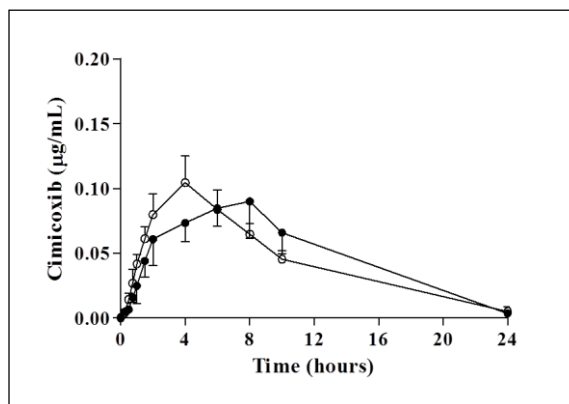
4.4.1 Trattamento con Cimicoxib al dosaggio di 2 mg/Kg

4.4.1.1 Farmacocinetica nel cavallo

Durante l'intero esperimento non sono stati osservati effetti negativi oggettivi sia negli animali trattati a stomaco pieno che in quelli trattati a digiuno fino alle 24 h dopo la somministrazione del farmaco.

Le curve concentrazione vs tempo dopo somministrazione intragastrica di CX sono riportate nella **Figura 16**. In entrambe c'è stato un rapido assorbimento iniziale per 2 h seguito da un meno veloce aumento della concentrazione fino al raggiungimento della concentrazione massima. Il CX è stato rilevabile fino a 24 h dopo la somministrazione del farmaco.

Figura 16 Curva concentrazione-tempo relativa a plasma di cavalli dopo somministrazione di Cimicoxib (2 mg/Kg) (n=5) in condizioni di digiuno (cerchio vuoto) e di stomaco pieno (cerchio pieno). Le barre rappresentano le deviazioni standard.



La T_{max} è stata registrata a circa 4 h nei cavalli trattati a digiuno, mentre a circa 10 h nei cavalli trattati a stomaco pieno. Le C_{max} non sono risultate significativamente differenti con un valore attorno a 0.1 µg/ml.

I più importanti parametri farmacocinetici sono riportati nella **Tabella 3**.

Non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi di trattamento ad eccezione del valore di T_{max} .

Tabella 3 Parametri farmacocinetici del cimicoxib (2 mg/kg) in cavalli digiuni (n=3) ed a stomaco pieno (n=2) dopo somministrazione orale.

Parametri	Unità	Media \pm SD	
		Digiuno	Stomaco Pieno
R²		0.99 \pm 0.01	0.99 \pm 0.003
Lambda_z	1/hr	0.18 \pm 0.05	0.21 \pm 0.03
HL_Lambda_z	Hr	4.12 \pm 1.14	3.26 \pm 0.57
T_{max}	Hr	3.66 \pm 0.81*	6.66 \pm 2.42
C_{max}	μg/mL	0.12 \pm 0.03	0.10 \pm 0.01
AUC_{last}	hrμg/mL	1.08 \pm 0.13	1.15 \pm 0.18
Vz/F	mL/kg	10.43 \pm 1.68	8.091 \pm 1.31
Cl/F	mL/hr/kg	1.81 \pm 268	1.74 \pm 337
AUMC_{last}	hrhrμg/mL	7.69 \pm 1.21	9.07 \pm 2.02
MRT_{last}	Hr	7.03 \pm 0.37	7.76 \pm 0.64

R²=coefficiente di correlazione; **Lambda_z**=costante della fase terminale;

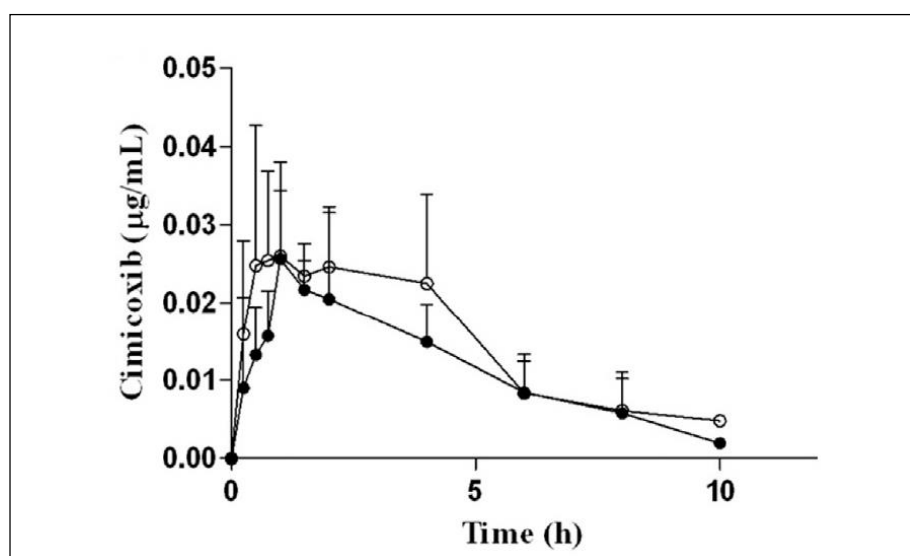
HL_Lambda_z=emivita della fase terminale; **T_{max}**=tempo per raggiungere la C_{max}; **C_{max}**=concentrazione massima; **AUC_{last}**=area sotto la curva fino all'ultima concentrazione misurabile; **Vz/F**=volume di distribuzione apparente; **Cl/F**=clearance apparente; **AUMC_{last}**=momento dell'area sotto la curva calcolata all'ultima concentrazione misurabile; **MRT_{last}**=tempo di permanenza medio basato sui valori fino all'ultima concentrazione misurata; *=valore statisticamente differente dal gruppo a stomaco pieno.

4.4.1.2 Farmacocinetica nell'asino

Non sono stati osservati effetti avversi oggettivi in nessuna fase dello studio.

Le concentrazioni plasmatiche di CX sono risultate inferiori al limite di quantificazione, 10 ore dopo la somministrazione (**Figura 17**). Il valore di C max è risultato quasi sovrapponibile tra i due gruppi.

Figura 17 Curva concentrazione-tempo relativa a plasma di asini dopo somministrazione di cimicoxib (2 mg/Kg) (n=6) in condizioni di digiuno (cerchio vuoto) e di stomaco pieno (cerchio pieno). Le barre rappresentano le deviazioni standard.



Non sono state osservate differenze significative nei profili farmacocinetici degli animali trattati a digiuno ed a stomaco pieno.

Al contrario, i parametri farmacocinetici hanno evidenziato notevoli differenze intra- ed inter-soggetto con un valore di R^2 basso (**Tabella 4**). Questo risultato potrebbe essere causa della bassa concentrazione plasmatica del farmaco vicino al LOQ del metodo.

Tabella 4 Parametri farmacocinetici del cimicoxib (2 mg/Kg) in asini digiuni (n=3) ed a stomaco pieno (n=3) (media \pm deviazione standard) dopo somministrazione orale.

Parametri	Unità	2 mg/kg (n=3)	
		Digiuno	Stomaco Pieno
R²		0.92 \pm 0.05	0.96 \pm 0.01
Lambda_z	1/hr	0.29 \pm 0.12	0.26 \pm 0.21
HL_Lambda_z	Hr	2.72 \pm 1.39	5.17 \pm 5.38
T_{max}	Hr	1.66 \pm 2.02	1.55 \pm 0.50
C_{max}	μg/mL	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00
AUC_{last}	hrμg/mL	0.13 \pm 0.04	0.10 \pm 0.02
Vz/F_{obs}	mL/kg	46.639 \pm 8.379	75.051 \pm 43.458
Cl/F_{obs}	mL/hr/kg	13.861 \pm 7.147	13.828 \pm 6.435
AUMC_{last}	hrhrμg/mL	0.45 \pm 0.22	0.36 \pm 0.07
MRT_{last}	Hr	3.11 \pm 0.80	3.33 \pm 0.44

R²=coefficiente di correlazione; **Lambda_z**=costante della fase terminale; **HL_Lambda_z**=emivita della fase terminale; **T_{max}**=tempo per raggiungere la C_{max}; **C_{max}**=concentrazione massima; **AUC_{last}**=area sotto la curva fino all'ultima concentrazione misurabile; **Vz/F**=volume di distribuzione apparente; **Cl/F**=clearance apparente; **AUMC_{last}**=momento dell'area sotto la curva calcolata all'ultima concentrazione misurabile; **MRT_{last}**=tempo di permanenza medio basato sui valori fino all'ultima concentrazione misurata.

4.4.1.3 Concentrazioni plasmatiche relative al liquido sinoviale nel cavallo

In accordo con le basse concentrazioni plasmatiche di CX dello studio farmacocinetico, anche nel plasma sono state rilevate concentrazioni di farmaco prossime allo zero e pertanto prive di significato clinico.

4.4.2 Trattamento con Cimicoxib al dosaggio di 5 mg/Kg

4.4.2.1 Farmacocinetica nel cavallo

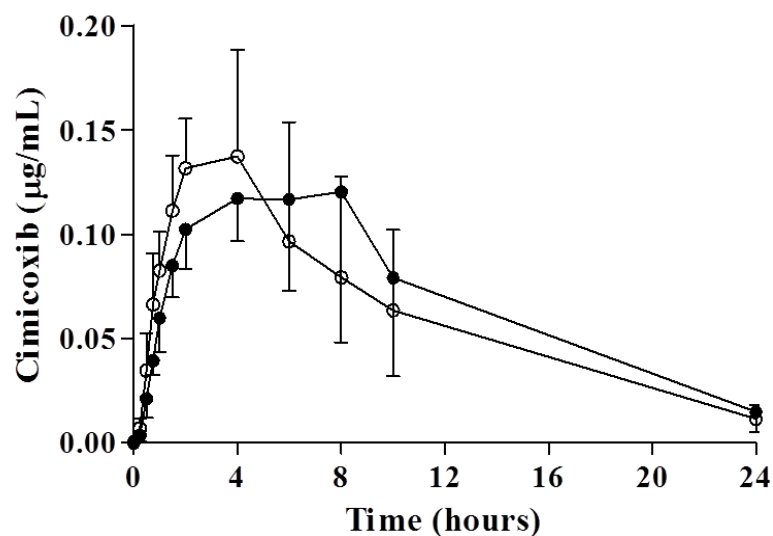
L'andamento della curva concentrazione-tempo (**Figura 18**) è simile a quella dello studio effettuato con un dosaggio di farmaco di 2 mg/Kg (**Figura 16**).

Il picco della concentrazione massima è leggermente spostato a destra nella curva del gruppo trattato a stomaco pieno rispetto a quello trattato a digiuno.

Le concentrazioni di farmaco sono rilevabili fino a 24 h dopo la somministrazione.

L'aumento delle concentrazioni plasmatiche non è stato proporzionale all'aumento del dosaggio se comparato con lo studio a 2 mg/kg.

Figura 18 Curva concentrazione-tempo relativa a plasma di cavalli dopo somministrazione di cimicoxib (5 mg/Kg) (n=5) in condizioni di digiuno (cerchio vuoto) e di stomaco pieno (cerchio pieno). Le barre rappresentano le deviazioni standard.



I principali parametri farmacocinetici sono riportati nella **Tabella 5**. Non ci sono state differenze significative tra i due gruppi di trattamento.

Tabella 5 Parametri farmacocinetici del cimicoxib (5 mg/Kg) in cavalli a stomaco pieno (n=5) e digiuni (n=5) dopo somministrazione orale.

Parametri	Unità	Media \pm SD	
		Digiuno	Stomaco Pieno
R²		0.99 \pm 0.002	0.99 \pm 0.002
Lambda_z	1/hr	0.12 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02
HL_Lambda_z	Hr	5.96 \pm 1.79	5.63 \pm 1.01
T_{max}	Hr	3.25 \pm 1.17	5.91 \pm 3.23
C_{max}	µg/mL	0.16 \pm 0.01	0.14 \pm 0.03
AUC_{last}	hrµg/mL	1.49 \pm 0.60	1.61 \pm 0.72
Vz/F	mL/kg	33.34 \pm 21.790	32.24 \pm 30.18
Cl/F	mL/hr/kg	3.87 \pm 2.22	4.067 \pm 3.32
AUMC_{last}	hrhrµg/mL	10.96 \pm 5.77	13.22 \pm 7.07
MRT_{last}	Hr	6.85 \pm 1.51	7.70 \pm 1.48

R²=coefficiente di correlazione; **Lambda_z**=costante di fase terminale; **HL_Lambda_z**=emivita terminale; **T_{max}**=tempo per raggiungere la C_{max}; **C_{max}**=concentrazione massima; **AUC_{last}**=area sotto la curva fino all'ultima concentrazione misurabile; **Vz/F**=volume di distribuzione della fase terminale; **Cl/F**=clearance della fase terminale; **AUMC_{last}**=area sotto la curva calcolata al momento dell'ultima osservazione; **MRT_{last}**=tempo di permanenza medio basato sui valori fino all'ultima concentrazione misurata.

Come per lo studio precedente, è stata osservata una certa variabilità nei parametri farmacocinetici. Sono stati ottenuti rispettivamente per cavalli digiuni ed a stomaco pieno un valore di C_{max} = 0.16 mg/mL ad un T_{max} di 3.5 h ed un valore di C_{max} = 0.14 mg/mL ad un T_{max} di 5.91 h.

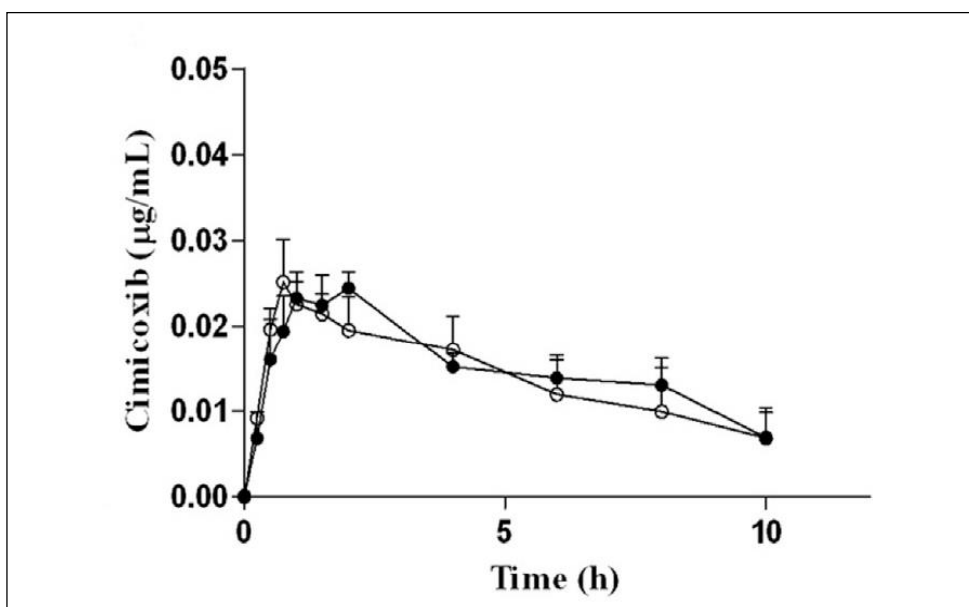
Inoltre, entrambi i gruppi hanno mostrato valori di AUC_{last} simili con un valore di emivita di 5-6 h.

4.4.2.2 Farmacocinetica nell'asino

Le concentrazioni plasmatiche di CX sono risultate inferiori al limite di quantificazione, 10 h dopo la somministrazione, così come nel precedente studio effettuato con un dosaggio di farmaco di 2 mg/Kg. Anche in questo caso l'aumento delle concentrazioni plasmatiche non è stato proporzionale all'aumento del dosaggio se comparato con lo studio a 2 mg/kg.

La curva concentrazione-tempo è riportata nella **Figura 19**.

Figura 19 Curva concentrazione-tempo in asini dopo somministrazione orale di cimicoxib (5 mg/Kg) (n=6) in condizioni di digiuno (cerchio vuoto) e di stomaco pieno (cerchio pieno).



I parametri farmacocinetici sono riportati nella **Tabella 6**. Non ci sono state differenze significative tra i due gruppi di trattamento.

Tabella 6 Parametri farmacocinetici del cimicoxib (5mg/Kg) in asini digiuni (n=6) ed a stomaco pieno (n=6) (media \pm deviazione standard) dopo somministrazione orale.

Parametri	Unità	5 mg/kg (n=6)	
		Digiuno	Stomaco Pieno
R²		0.90 \pm 0.03	0.80 \pm 0.13
Lambda_z	1/hr	0.19 \pm 0.15	0.13 \pm 0.06
HL_Lambda_z	Hr	5.28 \pm 3.49	5.89 \pm 2.48
T_{max}	Hr	1.00 \pm 0.43	1.66 \pm 0.57
C_{max}	µg/mL	0.02 \pm 0.005	0.02 \pm 0.004
AUC_{last}	hrµg/mL	0.14 \pm 0.05	0.15 \pm 0.03
Vz/F_{obs}	mL/kg	175.00 \pm 18.81	195.300 \pm 69.291
Cl/F_{obs}	mL/hr/kg	32.40 \pm 22.35	24.44 \pm 7.64
AUMC_{last}	hrhrµg/mL	0.58 \pm 0.34	0.65 \pm 0.18
MRT_{last}	Hr	3.90 \pm 0.92	4.29 \pm 0.32

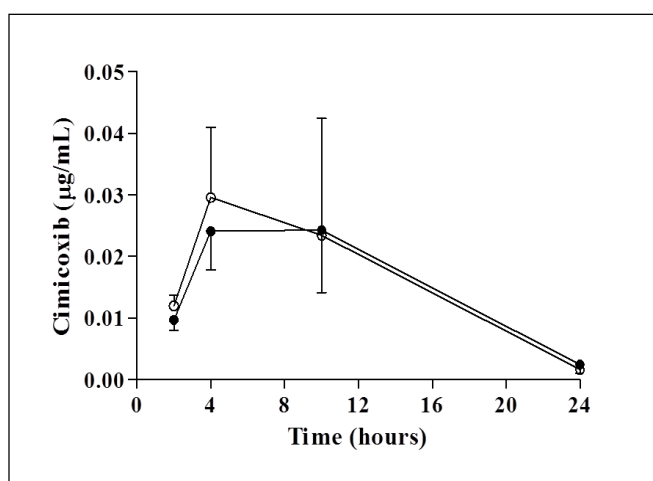
R²=coefficiente di correlazione; **Lambda_z**=costante della fase terminale; **HL_Lambda_z**=emivita della fase terminale; **T_{max}**=tempo per raggiungere la C_{max}; **C_{max}**=concentrazione massima; **AUC_{last}**=area sotto la curva fino all'ultima concentrazione misurabile; **Vz/F**=volume di distribuzione apparente; **Cl/F**=clearance apparente; **AUMC_{last}**=momento dell'area sotto la curva calcolata all'ultima concentrazione misurabile; **MRT_{last}**=tempo di permanenza medio basato sui valori fino all'ultima concentrazione misurata.

4.4.2.3 Concentrazioni plasmatiche relative al liquido sinoviale nel cavallo

Il profilo di concentrazione sinoviale del CX ha seguito un trend simile a quello plasmatico. Tuttavia, agli stessi tempi di prelievo il liquido sinoviale ha mostrato concentrazioni inferiori rispetto al plasma in un range compreso tra 1.6 e 20%. Le curve sinoviali sono mostrate in **Figura 20**.

Non è stata riscontrata nessuna differenza significativa nei due gruppi di trattamento (a stomaco pieno e digiuni).

Figura 20 Curva concentrazione-tempo in cavalli relativa al liquido sinoviale dopo somministrazione di cimicoxib (n=5) in condizioni di digiuno (cerchio vuoto) e di stomaco pieno (cerchio pieno). Le barre rappresentano le deviazioni standard.



4.5 Farmacodinamica

Gli studi farmacodinamici sono stati eseguiti solo nella specie equina a causa degli elevati costi dei kit ELISA necessari per svolgere gli stessi.

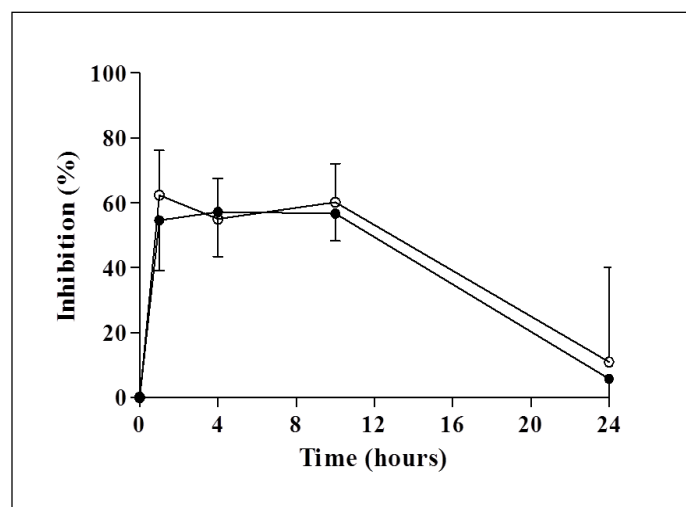
- *Trattamento al dosaggio di 2 mg/kg:*

In seguito alle basse concentrazioni plasmatiche di farmaco rilevate nel trattamento con CX a 2 mg/kg si è ritenuto poco significativo eseguire gli studi farmacodinamici a questo dosaggio.

- *Trattamento al dosaggio di 5 mg/kg:*

Sono stati valutati i livelli di TxB2 e di PgE2 ai tempi di 0, 1, 4, 10 e 24 h dopo la somministrazione del farmaco. Il tasso di inibizione ha mostrato un andamento diverso per entrambi i mediatori. La percentuale di inibizione dei TxB2 è risultata di circa il 60 – 65 % ad 1 h e si è mantenuta tale fino a 10 ore dopo la somministrazione. Il relativo tasso di inibizione è stato di 62.4 ± 13.8 % e di 54.6 ± 15.4 %, rispettivamente per gli animali in condizioni di stomaco pieno e di digiuno, senza quindi mostrare differenze significative (**Figura 21**).

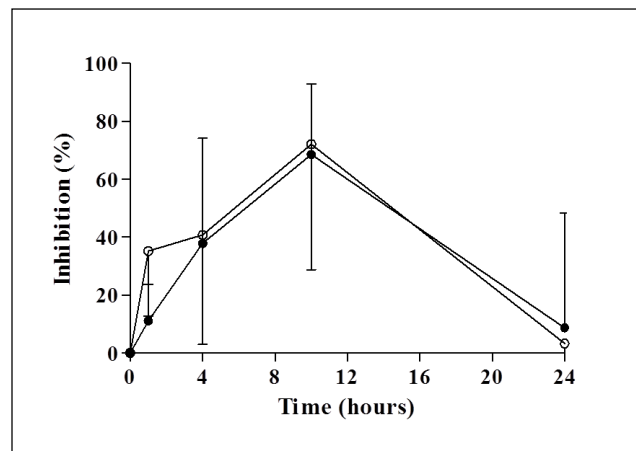
Figura 21 Analisi ex-vivo della percentuale di inibizione dei TxB2 nei cavalli a stomaco pieno e digiuni dopo somministrazione orale di cimicoxib (5 mg/Kg). Le barre rappresentano le deviazioni standard.



Differentemente, la percentuale di inibizione delle PgE2 è aumentata gradualmente fino a raggiungere il valore massimo (circa 70%) 10 h dopo la somministrazione del

farmaco. La differenza in percentuale di inibizione dalle PgE2 tra i due trattamenti è risultata statisticamente non significativa (**Figura 22**).

Figura 22 Analisi ex-vivo della percentuale di inibizione delle PgE2 nei cavalli a stomaco pieno e digiuni dopo somministrazione orale di cimicoxib (5 mg/Kg). Le barre rappresentano le deviazioni standard.



5. Discussione

Il Cimalgex[®], nome commerciale del CX, è un farmaco di recente rilascio ed attualmente commercializzato per il trattamento dell'infiammazione e del dolore nel cane. È un coxib di seconda generazione, inibitore COX-2 altamente selettivo che mostra una buona attività antinfiammatoria ed analgesica. Originariamente sviluppato per il trattamento della depressione e della schizofrenia nell'uomo (Almansa et al., 2013), ha mostrato (dopo somministrazione orale) attività paragonabile ad altri coxib quando testato in modelli sperimentali per il trattamento dell'infiammazione e del dolore acuto e cronico (Rigau et al., 2003; Sorbera e Ramis, 2004).

Dopo alcuni anni di sviluppo clinico come agente antiinfiammatorio ed analgesico negli esseri umani, il CX è stato recentemente lanciato sul mercato per uso veterinario (Emmerich, 2012).

Si è riscontrato che ha una bassa solubilità in acqua, è ampiamente distribuito dopo somministrazione orale, viene eliminato principalmente attraverso le feci (75%) ed è escreto per via biliare (Kim et al., 2013).

Recentemente è stato condotto uno studio per valutare l'efficacia del CX nel controllo del dolore perioperatorio nei cani, dal quale è emerso che la somministrazione di 2 mg/Kg, una volta al giorno, per 6 giorni dopo l'intervento, è un metodo efficace e sicuro di controllo del dolore per cani sottoposti a chirurgia ortopedica (Grandemange et al., 2013).

Nel presente studio sono stati per la prima volta valutati i parametri farmacocinetici e farmacodinamici del CX nella specie equina. Il farmaco non ha mostrato effetti avversi oggettivi negli animali in studio, anche se è stato somministrato ad un dosaggio equivalente a 2.5 volte la dose clinica raccomandata nel cane. Questa era in linea con la precedente valutazione del margine di sicurezza del CX nel tratto gastrointestinale, nel sistema nervoso e nell'apparato cardiorespiratorio (Rigau et al., 2003).

La metodica utilizzata è risultata relativamente semplice, economica e di rapida esecuzione. L'HPLC con rilevatore fluorimetrico (HPLC-FL) è stato sensibile e accurato alla pari del notevolmente più costoso spettrofotometro di massa (HPLC-MS) con cui

vengono normalmente sviluppati questi studi. Lo studio del CX attraverso il rilevatore FL ha permesso una riduzione dei costi, offrendo la possibilità di condurre questo tipo di analisi anche in laboratori meno attrezzati.

Lo standard interno (PX) è stato scelto e testato per la somiglianza molecolare con il CX. Il PX ha infatti mostrato simile solubilità e risposta al detector FL del CX.

Tutti i reagenti utilizzati nel presente studio sono stati scelti per la loro facile reperibilità, maneggevolezza e basso costo. La metodica in toto è risultata semplice, facilmente replicabile e intuitiva. Il LOQ è stato di 10 ng/mL e quindi soddisfacente per gli studi farmacocinetici.

Per quanto riguarda la farmacocinetica nei cavalli, inizialmente tutti i soggetti sono stati trattati con un dosaggio di CX di 2 mg/Kg. Questa dose è stata scelta in funzione delle informazioni relative al prodotto e corrispondenti alla dose giornaliera consigliata nei cani (Grandemange et al., 2013) nonché al dosaggio clinico riportato in etichetta.

Uno studio precedente effettuato sui cani ha rilevato come il cibo non influenzi significativamente l'assorbimento del CX (Kim et al., 2014). Sia nello studio a 2 mg/Kg, che in quello a 5 mg/Kg è stato osservato un ritardo di assorbimento quando il farmaco è stato somministrato insieme al cibo, in linea con uno studio precedente relativo ad un altro farmaco antiinfiammatorio non COX-2 selettivo (fenilbutazone)(Maitho et al., 1986). Tuttavia, la differenza nei valori di T_{max} non ha avuto significatività statistica a causa della grande variabilità inter-individuale. La variazione di T_{max} potrebbe essere stata dovuta alla natura fibrosa del cibo che ha ostacolato il contatto della compressa con le secrezioni gastriche. Tuttavia il cibo non ha ostacolato l'assorbimento del farmaco, che è stato infatti determinato dall'esposizione sistemica del farmaco, l'AUC.

Nel presente studio, dopo somministrazione orale di cimicoxib al dosaggio di 2 mg/Kg a 5 cavalli sani, l'emivita media è risultata di 4 h, valore simile a quello osservato nei cani (Kim et al., 2014). Tuttavia, la C_{max} nei cavalli è risultata essere uguale a circa 0.1 mg/mL, valore relativamente basso rispetto a quello osservato nei cani (0.4 mg/mL) trattati con la stessa dose di farmaco (Kim et al., 2014). Inoltre, la C_{max} osservata nei cavalli risulta essere solo il 50% circa della concentrazione minima efficace (MEC, 0.2

g/mL) calcolata nei cani [Anonymous, 2011a]. A causa di questa bassa concentrazione plasmatica, dopo un periodo di wash-out di due settimane, la dose somministrata di farmaco è stata aumentata a 5 mg/Kg. I dati relativi a questo dosaggio hanno evidenziato un aumento dei valori sia di C_{max} che dell'AUC rispetto allo studio precedente (2 mg/Kg). Tuttavia questi valori non sono stati proporzionali all'incremento della dose. Infatti, anche con un dosaggio incrementato di 2.5 volte (5 mg/Kg), non sono stati osservati livelli di concentrazione plasmatica elevati quanto nei cani. Questo suggerisce una biodisponibilità relativamente bassa oppure un'elevata clearance plasmatica. Questo risultato è in linea con un recente studio nei cani, che evidenzia come la distribuzione di CX dopo una somministrazione orale non è lineare per dosi da 1 a 4 mg/Kg a causa della limitata solubilità del farmaco (Jeunesse et al., 2013). Questo comportamento può essere attribuito alle differenze di specie: infatti, farmaci come l'ampicillina e l'amoxicillina hanno mostrato una biodisponibilità orale rispettivamente dello 0-1 % e del 5 % nei cavalli, mentre del 30 % e del 60-80 % nei cani (Ensink et al., 1992; Ensink et al., 1996; Kung et al., 1994; Schulze et al., 2005). Essendo il CX una molecola scarsamente solubile in acqua non è stato possibile effettuare la somministrazione IV per poterne valutare il valore di biodisponibilità orale.

Ci sono diverse possibili spiegazioni relative alla bassa concentrazione plasmatica osservata nei cavalli. Un motivo potrebbe essere l'elevato valore di Cl/F plasmatica. Infatti, dopo lo stesso trattamento in cani e cavalli, la clearance plasmatica del CX è risultata essere molto più elevata nei cavalli (1.812 mL/h/Kg) rispetto che nei cani (413.9 mL/h/Kg). Secondo un precedente studio il CX viene eliminato principalmente con le feci, attraverso due vie metaboliche, glucuronidazione e demetilazione [Anonymous, 2011a]. Le reazioni della fase II, tra cui glucuronidazione, acetilazione e solfatazione, hanno mostrato significative differenze tra le specie, ed il cavallo è risultato essere una specie con capacità relativamente alta di glucuronidazione (Toutain et al., 2010). Inoltre, i valori del pH gastrico equino sono risultati essere molto variabili nelle diverse regioni dello stomaco, questo potrebbe aver influenzato (diminuito) l'assorbimento del farmaco in base al suo valore di pK_a (Murray et al., 1989). Inoltre, l'assunzione giornaliera di mangime fibroso potrebbe coprire le cripte

della parete intestinale, riducendo l'assorbimento del farmaco rispetto ad altre specie animali (Baggot e Brown, 1998). Anche la formulazione farmaceutica potrebbe aver influenzato la biodisponibilità; infatti le compresse di CX somministrate in questo studio sono state formulate appositamente per i cani. Queste compresse contengono lattosio monoidrato, povidone K25, crospovidone, sodio laurilsolfato, macrogol 400, sodio stearilfumarato e fegato di maiale in polvere, che potrebbero aver ridotto l'assorbimento del farmaco nel cavallo. Ulteriori studi relativi alla dissoluzione di queste compresse formulate per i cani nel fluido gastrico degli equini potrebbero suggerire una appropriata formulazione per i cavalli.

La farmacocinetica nell'asino, dopo somministrazione di CX per os alla dose di 2 mg/Kg ha evidenziato un valore di C_{max} di 0.03 mg/mL circa 1.5 h dopo la somministrazione. Questo parametro era inferiore e raggiunto più rapidamente, rispetto a quello osservato nei cani trattati con la stessa dose (0.5 mg/mL a 3 h) [Kim et al., 2013]. Secondo l'analisi del test di varianza per uno studio cross-over, è stato osservato un valore più elevato di Cl/F di CX negli asini (13.861 mL/h/Kg) rispetto ai cani (495 mL/h/Kg) ed ai cavalli (1.812 mL/h/Kg) (10).

Inoltre, il volume di distribuzione (V_z/F) del CX negli asini è risultato essere uguale a 46.693 mL/Kg, ovvero 20 volte superiore rispetto a quello osservato nei cani (Kim et al., 2013). Tuttavia, sia la clearance che il volume di distribuzione dopo somministrazione orale sono legati alla dose funzionale, per cui la diversa biodisponibilità del farmaco in queste due specie animali potrebbe aver influito su questi due parametri.

Uno studio precedente ha mostrato che un dosaggio di CX di 2 mg/Kg somministrato per via orale ha efficacia e tollerabilità simile al carprofen nei cani [Grandemange et al., 2013]. Mentre il presente studio farmacocinetico riporta concentrazioni plasmatiche di CX inferiori alla media e valori di AUC inferiori (>20 volte) rispetto a quelli osservati nei cani. Negli asini trattati con CX al dosaggio di 5 mg/Kg, anche se la dose è stata aumentata di 2.5 volte, la C_{max} non è risultata essere significativamente differente da quella osservata con il dosaggio di 2 mg/Kg. La concentrazione minima efficace di CX nei cani è stata valutata essere 0.2 mg/mL [Anonymous, 2011a]. E'

improbabile che le concentrazioni plasmatiche di farmaco ottenute in questo studio possano produrre riduzione del dolore negli asini.

Il CX ha mostrato un valore basso per quanto riguarda la media dell'area sotto la curva (AUC) dopo somministrazione intragastrica negli asini. Inoltre, la distribuzione del farmaco e l'eliminazione sono state differenti da quelle riportate per i cavalli [Kim et al., 2014]. La maggior parte dei parametri farmacocinetici correlati con l'assorbimento e l'AUC sono risultati relativamente bassi rispetto a quelli osservati nei cavalli. Questa tendenza è stata riportata precedentemente per molti altri FANS come fenilbutazone, flunixin meglumina e meloxicam (Coakley et al., 1999; Sinclair et al., 2006). Inoltre, nel trattamento degli asini con CX al dosaggio di 5 mg/Kg del presente studio, l'AUC ed il tempo medio residuo (MRT) sono stati rispettivamente 10 e 2 volte inferiori rispetto l'AUC e l'MRT ottenuti dai cavalli trattati con lo stesso dosaggio di CX. Il basso valore di MRT potrebbe essere indicativo di un sostanziale metabolismo di primo passaggio epatico, ma dovrebbe essere effettuata una somministrazione IV per poter validare questa ipotesi. Purtroppo, la scarsa solubilità del farmaco in acqua non consente di somministrare il CX per via IV. Infatti non è ad oggi presente nessuna formulazione IV di CX sul mercato.

Le differenze nella farmacocinetica tra asino e cavallo potrebbero derivare dalle diverse caratteristiche fisiologiche, che possono influenzare l'assorbimento e la distribuzione del farmaco nei vari sistemi (Grosenbaugh et al., 2011). Gli asini sono animali originari del deserto e sono in grado di mantenere il volume e la funzionalità del sangue anche quando sono disidratati al 20%, questo indica che rispetto ai cavalli hanno una diversa quantità di fluidi nei vari distretti (Yousef et al., 1970). Inoltre, il metabolismo epatico degli asini è risultato essere più veloce rispetto a quello dei cavalli per vari farmaci (Matthews et al., 1997; Mealey et al., 1997; Lee et al., 2004). Questo studio ha dimostrato che le variazioni interspecie possono influenzare la farmacocinetica del CX. Queste differenze devono essere considerate quando vengono estrapolati i dati da una specie ad un'altra.

Inoltre, le differenze osservate nella farmacocinetica tra asino e cavallo potrebbero essere dovute al fatto che nella somministrazione del farmaco agli asini, vista l'esigenza di dover utilizzare una sonda nasogastrica di dimensioni minori rispetto a

quella utilizzata per i cavalli, il CX è stato disgregato e somministrato in sospensione. Questo potrebbe aver aumentato la velocità di transito del CX attraverso lo stomaco, indirizzandolo verso l'intestino, dove il pH basico potrebbe averne ridotto l'assorbimento.

Per quanto riguarda la farmacodinamica nel cavallo, esistono diversi studi in vitro effettuati per valutare la potenza di una vasta gamma di FANS come inibitori delle isoforme di COX. Studi effettuati da altri autori (Warner et al., 1999; Lees et al., 2004), hanno messo in evidenza la variabilità dei risultati in relazione a diverse cause, quali le stesse condizioni sperimentali, gli enzimi isolati, differenti soluzioni tampone utilizzate, ed altro. La maggior parte degli studi in vitro vedono l'utilizzo di sangue intero per motivi di maggior significato fisiologico. Questi studi utilizzano una matrice costituita da un fluido corporeo naturale contenente sia piastrine che leucociti, per il motivo che può essere osservato un alto grado di legame del farmaco alle proteine plasmatiche, che caratterizza la maggior parte dei FANS (Pairet e Van Ryn, 1998). Tuttavia, anche gli studi effettuati sul sangue in vitro, possono dare valori differenti da quelli ottenuti ex vivo ed in vivo per singoli farmaci. Infatti in questo studio sono state effettuate analisi ex vivo per determinare l'inibizione dei TxB₂ e delle PgE₂, che sono parametri rappresentativi rispettivamente delle COX-1 e COX-2.

Sebbene la C_{max} è spesso inferiore rispetto alla MEC (nel cane, 0.2 mg/mL), il CX somministrato in cavalli al dosaggio di 5 mg/Kg ha evidenziato un tasso di inibizione delle PgE₂ di oltre il 70%. Questa differenza potrebbe essere stata causata dalla diversa percentuale di legame con le proteine plasmatiche nelle diverse specie animali. Tuttavia, le curve della percentuale di inibizione vs tempo non erano in fase con la curva concentrazione-tempo. Il periodo di massimo effetto è stato osservato circa 6 h dopo il picco di T_{max} . La concentrazione di farmaco nel sangue in certi punti non può essere correlata direttamente all'effetto, dato l'intervallo di tempo tra T_{max} (PK) ed il tempo di massima inibizione (PD). Ciò è in linea con la maggior parte dei farmaci FANS, i quali hanno mostrato un ampio ciclo antiorario di isteresi (Torres – Lopez et al., 1997; Toutain, 2002; Pleuvry, 2005). Questo può verificarsi anche per farmaci come l'aspirina, il fenilbutazone ed il tepoxalin, che in vivo vengono convertiti in metaboliti attivi (Lees et al., 2004).

Anche i TxB2 sono stati inibiti dal trattamento con CX, ma con una velocità diversa rispetto alle PgE2. Il tasso di inibizione è risultato inferiore rispetto a quello delle PgE2 ed il picco di inibizione dei TxB2 è stato trovato ad 1 h dopo la somministrazione di CX. Il motivo per il quale è stato osservato questo intervallo di tempo tra l'inibizione di COX-1 e COX-2 non è noto. Nonostante si sia verificata in maniera inaspettata la duplice inibizione di entrambe le isoforme delle COX in una molecola classificata come coxib, è importante sottolineare che il termine "coxib" è utilizzato per indicare una classe di molecole che possiedono un anello triciclico ed un gruppo metilico-solfonico, ed è spesso impropriamente associato ai COX-2 selettivi. La classe dei coxib include anche molecole COX-1 selettive come il composto sperimentale SC-560 (Teng et al., 2003).

Le differenti specie animali potrebbero aver giocato un ruolo fondamentale nel determinare la selettività del CX. Infatti, questo non è stato il primo caso in cui un farmaco antiinfiammatorio ha mostrato selettività in una specie e non selettività in un'altra. Quindi, la mancanza di selettività potrebbe essere dovuta soltanto alla specie animale trattata. Risultati simili sono stati ottenuti per il carprofene, anche se esso non ha una struttura coxib. Secondo Lees et al. (2004) il carprofene può agire come farmaco non selettivo nel cavallo ed essere invece COX-2 selettivo nel cane e nel gatto. Mentre, da uno studio precedente si è visto che il fenilbutazone ha una potenza relativamente alta nei cavalli rispetto ad altre specie, tra cui i cani e gli esseri umani (Higgins e Lees, 1983; Gierse et al., 2002).

Sono necessari ulteriori studi per valutare la selettività del CX nel cavallo. E' interessante notare che, anche se la concentrazione massima plasmatica di CX è stata inferiore al IC50 riportato nei cani, ha rivelato una buona attività nei confronti dei marcatori per l'infiammazione ed il dolore nel cavallo.

6. Conclusione

Cavallo

I parametri farmacocinetici osservati nel presente studio hanno evidenziato bassi valori di C_{max} plasmatica nel cavallo dopo somministrazione orale di CX, sia nel trattamento a 2 mg/Kg che nel trattamento a 5 mg/Kg. Sebbene la concentrazione plasmatica di farmaco necessaria per inibire le COX sia stata inferiore rispetto a quella necessaria nei cani, il CX nel cavallo è risultato essere un antiinfiammatorio COX-2 non selettivo.

Anche se sono necessari ulteriori studi sul farmaco in questa specie, una singola somministrazione orale di CX a 5 mg/Kg nel cavallo non ha rivelato effetti avversi oggettivi.

Asino

Nell'asino, dopo somministrazione orale di CX, è stato osservato un valore di Cl/F molto più elevato rispetto a quelli osservati per cani e cavalli; nonché un valore di V_z/F di circa 20 volte superiore rispetto a quello osservato nei cani. Inoltre, i valori di C_{max} , sia in seguito al trattamento a 2 mg/Kg che a quello a 5 mg/Kg non sono risultati essere simili a quelli evidenziati in altre specie animali. Le differenze nei parametri farmacocinetici osservate tra asini e cavalli potrebbero essere dovute alle differenze fisiologiche tra le due specie, nonché al fatto che negli asini il CX è stato somministrato in sospensione.

I parametri farmacocinetici osservati indicano che il CX al dosaggio orale di 5 mg/Kg potrebbe non raggiungere le concentrazioni plasmatiche necessarie per la riduzione del dolore.

Metodica analitica

La metodica HPLC si è rivelata rapida, sensibile ed economica. Questa metodica potrà quindi essere utilizzata per studi cinetici negli equini. Inoltre, vista l'esigua quantità di plasma necessario per l'analisi, il presente metodo potrebbe essere utilizzato per lo studio della cinetica del CX in specie animali dove non sia possibile il prelievo di larghi volumi ematici.

7. Bibliografia

- Almansa C, Bartrolí J, Cavalcanti FL, Ferrando R, Gómez LA, Ramis I, Carceller E, Merlos M, García-Rafanell J. New water-soluble sulfonylphosphoramidic acid derivatives of the COX-2 selective inhibitor cimicoxib. A novel approach to sulfonamide prodrugs. *J Med Chem*, 2013, 47: 5579-82.
- Anonymous. Daramaxx® (deracoxib), Flavors Tabs, full production information, Novartis. <http://deramaxx.ca/pdf/ProductLabel.pdf>. 2005.
- Anonymous. Equioxx® (firocoxib), Oral Paste for Horse, drug label, Merial. <http://www.fda.gov/download/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/DrugLabels/UCM050387.pdf>. 2006.
- Anonymous. Previcox® (firocoxib), Chewable Tablets for oral use in dog only, drug label, Meridal, 2007.
<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/DrugLabels/UCM050403>.
- Anonymous. Guidelines for validation of analytical procedures. Methodology-International. EMEA/CHMP/192217/2009.
- Anonymous. Doctors Gate, all you need to enjoy medicine, daily medical videos, cases, diagrams, animation, articles, free medical book and news. <http://doctorsgate.blogspot.com/2010/12/synthesis-of-eicosanoid-autocoids.html>. 2010a.
- Anonymous. The horse, New Products and Industry Press Releases. <http://cs.thehorse.com/blogs/press-release/archive/2010/09/30/merial-announces-introduction-of-equinoxx-174-firocoxib-injection-continuing-the-new-movement-in-equine-osteoarthritis-pain-management.aspx>. 2010b.
- Anonymous. Onsior® (robenacoxib), Allegato I, riassunto delle caratteristiche del prodotto. www.ema.europa.eu/.../document_library/EPAR_-2010c.Product_Information/veterinary/000127/WC500067759.pdf.
- Anonymous. EMA Report. European Medicines Agency. Veterinary medicines and product data management (EMA/CVMP/513842/2011), 2011a.

- Anonymous. Trocoxil® (mavacoxib), Anneex I, summary of product characteristics.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-2011b._Product_Information/veterinary/000132/WC50069279.pdf.
- Baggott JD, Brown SA. Basis for selection of the dosage form. In: Hardee GE, Baggott JD (Eds). Development and formulation of veterinary dosage forms, 2nd Edn, Marcel Dekker, New York, NJ, USA, 1998: 7-143.
- Barclay ML, Begg EJ, Hickling KG: What is the evidence for once-daily aminoglycoside therapy? Clin Pharmacokinet, 1994, 27: 32- 48.
- Boothe: The analgesic-antipyretic-antiflammatory drugs in: Adams HR (ed) Veterinary pharmacology and therapeutics, 7th edn. Iowa State University Press, Ames, IA, 1985, pp. 432-9.
- Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hocherg MC, Kvien TK, Shnitzer TJ. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patient with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group N Engl J Med, 2000, 343: 1520-8.
- Beech J, Leitch M, Kohn CW et al: Serum and synovial fluid levels of sodium ampicillin and ampicillin trihydrate in horses, J Equine Med Surg, 1979, 3: 3503-4.
- Brown MP, Gronwall RR, Houston AE: Pharmacokinetics and body fluid and endometrial concentrations of cefoxitin in mares, Am J Vet Res, 1986, 47: 1734-38,
- Brown SA, Riviere JE: Comparative pharmacokinetics of amino- glycoside antibiotics, J Vet Pharmacol Ther, 1991, 14: 1-35.
- Cambridge H, Lees P, Hooke RE: Antithrombotic actions of aspirin in the horse. Equine Vet J, 1991, 23: 123-7.
- Chavez ML, DeKorte CJ. Valdecoxib: a review. Clin Ther, 2003, 25: 817-51.
- Coakley M, Peck KE, Taylor TS, Matthews NS, Mealey KL. Pharmacokinetics of flunixin meglumine in donkeys, mules, and horses. Am J Vet Res, 1999, 60: 1441-4.

- Cox SR, Liao S, Payane-Johnson M, Zielinski RJ, Stegemann MR. Population pharmacokinetics of mavacoxib in osteoarthritic dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 2010, 34: 1-11.
- Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol*, 1997, 49: 15-9.
- Cummings LE, Guthrie AJ, Harkins JD: Pharmacokinetics of gentamicin in newborn to 30-day-old foals, *Am J Vet Res*, 1988, 51: 1988-92.
- Emmerich IU. New drugs for small animals in 2011. *Tierarztl Prax* , 2012, 40: 351-62.
- Ensink JM, Klein WR, Mevius DJ, Klarenbeek KA, Vulto AG. Bioavailability of oral penicillins in the horse: a comparison of pivampicillin and amoxicillin. *J Vet Pharmacol Ther*, 1992, 15: 221-30.
- Ensink JM, Vulto AG, Van Miert AS, Tukker JJ, Winkel MB, Fluitman MA. Oral bioavailability and in vitro stability of pivampicillin, bacampicillin, talampicillin, and ampicillin in horses. *Am J Vet Res*, 1996, 57: 1021-4.
- Esser R, Berry C, Du Z, Dawson J, Fox A, Fujimoto RA, Haston W, Kimble EF, Koehler J, Peppard J, Quadros E, Quintavalle J, Toscano K, Urban L, Var Duzer J, Zhang X, Zhou S, Marshall PJ. Preclinical pharmacology of lumiracoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *Br J Pharmacol*, 2005, 144: 538-50.
- Fantin B, Carbon C: In vivo antibiotic synergism: contribution of animal models. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36: 907-912.
- Flower DJ. The development of COX-2 inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2: 179-81.
- Foreman JH: Does ceftiofur cause diarrhea? Proceedings of the 44th AAEP Congress, Vancouver, British Columbia, Canada, 1994, pp. 146-7.
- Fu JY, Masferret JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem*, 1990, 265: 1637-40.
- Furst DE, Ulrich RW, Varkey-Altamirano C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, disease-modifying antirheumatic drugs, nonopioid analgesics, & drugs used in

gout. In: Basic & Clinical Pharmacology, Katzung B, Masters S, Trevor A (Eds), The McGraw-Hill. Companies Ed, San Francisco, CA, USA, 2009: 679-96.

- Frank G. R. Taylor, Tim J. Brazil, Mark H. Hilleyer. Diagnostic Techniques in Equine Medicine 2nd ed, 2010, pp 27-72.
- Gassel AD, Tobias KM, Cox SK. Disposition of deracoxib in cats after oral administration. J Am Anim Hosp Assoc, 2006, 42: 212-7.
Galbraith LA, Mc Kellar QA: Protein binding and in-vitro serum thromboxane B₂ inhibition by flunixin meglumine and meclofenamic acid in dog, goat and horse blood. Res Vet Sci, 1996, 61: 78-81.
- Gardner SY, Sweeney RW, Divers TJ: Pharmacokinetics of cefotaxime in neonatal pony foals, Am J Vet Res, 1993, 54: 576-579.
- Gibaldi M, Perrier D. Pharmacokinetics, 2nd ed, Marcel Dekker, New York, USA, 1982.
- Gierse MS, State NR, Casperson GF, Koboldt CM, Seibert K. Cloning, expression and selective inhibition of canine cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. Vet Ther, 2002, 3: 270-80.
- Giraudel JM, Toutain PL, Lees P. Development of in vitro assays for the evaluation of cyclooxygenase inhibitors and application for predicting the selectivity of NSAIDs in the cat. Am J Vet Res, 2005, 66: 700-9.
- Giraudel JM, Toutain PL, King JN, Lees P. Differential inhibition of cyclooxygenase isoenzymes by the NASID robenacoxib. J Vet Pharmacol Ther, 2009, 32: 31-40.
- Grandmange E, Fournel S, Woehrlé F. Efficacy and safety of cimicoxib in the control of perioperative pain in dogs. J Small Anim Pract, 2013, 54: 304-12.
- Grosenbaugh DA, Reinemeyer CR, Figueiredo MD. Pharmacology and therapeutics in donkeys. Equine Vet Educ, 2011, 23: 523-30.
- Haddad NS, Pedersoli WM, Ravis WR et al: Pharmacokinetics of gentamicin at steady-state in ponies: serum, urine, and endometrial concentrations, Am J Vet Res 46:1268-1271, 1985.
- Hanson PD, Brooks KC, Case J, Conzemius M, Gordon W, Schuessler J, Shelley B, Sifferman R, Drag M, Alva R, Bell L, Romano D, Fleishman C. Efficacy and safety

of firocoxib in the management of canine osteoarthritis under field condition. *Vet Ther*, 2006, 7: 127-40.

- Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacol*, 2012, 37: 137-62.
- Higgins AJ, Lees P. Phenylbutazone inhibition of prostaglandin E2 production in equine acute inflammatory exudate. *Vet Rec*, 1983, 113: 622-3.
- Hinz B, Renner B, Brune K. Drug Insight: cyclo-oxygenase-2 inhibitors a critical appraisal. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007, 3: 552-60.
- Hoffman AM, Viel L, Prescott JF: Microbiologic changes during antimicrobial treatment and rate of relapse of distal respiratory tract infections in foals, *Am J Vet Res*, 1993, 54:1608-14.
- Isakson PC, Zweifel B, Masferrer J, Koboldt C, Seibert K, Hubbard R, Geis S, Needleman P. Specific COX-2 inhibitors: from bend to bedside. In: Selective Cox-2 Inhibitors: Pharmacology. Clinical Effects and Therapeutic Potential. Vane J, Botting J, Eds, Kluwer Academic Publisher Ed, London, UK: 127-33.
- Jensen R C, Fischer J H, Cwik M J: Effect of age and training status on pharmacokinetics of flunixin meglumine in thoroughbreds. *American Journal of Veterinary Research*, 1990, 51: 591-594.
- Jeunesse EC, Schneider M, Woehrle F, Faucher M, Lefebvre HP, Toutain PL. Pharmacokinetic / pharmacodynamic modeling for the determination of a cimicoxib dosing regimen in the dog. *BMC Vet Res*, 2013, 9: 250-64.
- Johansson IM, Kalling P, Hammarlund-Udenaes M: Studies of meclofenamic acid and two metabolites in horses: pharmacokinetics and effects on exercise tolerance. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 1991, 14: 235-242.
- Jung M, Seewald P, King J. Analytical determination and pharmacokinetics of robenacoxib in the dog. *J Vet Pharmacol Ther*, 2008, 32: 41-8.
- Kahn L H, Styrt B A 1997 Necrotizing soft tissue infections reported with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Annals of Parapharmacotherapy* 31:1034-39.

- Kim TW, Giorgi M. A brief overview of the COXIBs drugs in the veterinary field. *Am J Anim Vet Sci*, 2013, 8: 89-99.
- Kim TW, Lebkowska-Wieruszewska B, Owen H, Yun HI, Kowalski CJ, Giorgi M, 2014. Pharmacokinetics profiles of the novel COX-2 selective inhibitor cimicoxib in dogs. *Vet J*, 2014, 200: 77-81.
- King JN, Dawson J, Esser DJ, Fujimoto RK, Maniara WM. Preclinical pharmacology of robenacoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *J Vet Pharmacol Ther*, 2009, 32: 1-17.
- King JN, Rudaz C, Boner L, Jung M, Seewald W, Lees P. In vitro and ex vivo inhibition of canine cyclooxygenase isoforms by robenacoxib: A comparative study. *Res Vet Sci*, 2010, 88: 497-506.
- Kopp KJ, Moore JN, Bjars TD et al 1985 Template bleeding time and thromboxane generation in the horse: effects of three non-steroidal antiinflammatory drugs. *Equine Veterinary Journal* 17: 322-324.
- Kung K, Wanner M. Bioavailability of different forms of amoxycillin administered orally to dogs. *Vet Rec*, 1994, 135: 552-4.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Bio Chem*, 1991, 266: 12866-72.
- Kvaternick V, Pollmeier M, Fischer J, Hanson PD. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. *J Vet Pharmacol Ther*, 2007, 30: 208-17.
- Landoni M F, Lees P: Comparison of the anti-inflammatory action of flunixin meglumine and ketoprofen in horses applying PK/PD modeling. *Equine Vet. J.* 1995, 27: 322-324.
- Landoni M F, Lees P: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen enantiomers in the horse *J Vet Pharmacol Ther*, 1996, 19: 466-474.
- Langford RM, Mehta V. Selective cyclooxygenase inhibition: its role in pain and anaesthesia. *Biomed Pharmacother*, 2006, 60: 323-28.

- Lees P, Higgins AJ: Clinical Pharmacology and therapeutic use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the horse, *Equine Vet J*, 1985, 17:83-96.
- Lees P, Ewins CP, Taylor JBO et al: Serum thromboxane in the horse and its inhibition by aspirin, phenylbutazone and flunixin. *British veterinary journal*, 1987, 143:462-76.
- Lees P, McKellar Q A, May S A et al: Pharmacodynamics and pharmacokinetics of carprofen in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 1994, 26:203-8.
- Lees P, Landoni MF, Giraudel J, Toutain PL. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *J Vet Pharmacol Ther*, 2004, 27: 479-90.
- Luong C, Miller A, Barrett J, Chow J, Ramesha C, Browner MF. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of the human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol*, 1996, 3: 937-43.
- Maitho TE, Lees P, Taylor JB. Absorption and pharmacokinetics of phenylbutazone in Welsh Mountain ponies. *J Vet Pharmacol Ther*, 1986, 9: 26-39.
- Matthews NS, Peck KE, Mealey KL, Taylor TS, Ray AC. Pharmacokinetics and cardiopulmonary effects of guaifenesin in donkeys. *J Vet Pharmacol Ther*, 1997, 20: 442-6.
- May SA, Lees P: Non-steroidal anti-inflammatory drugs in: MacIlwraith CW, Trotter GW (eds) *Joint disease in the horse*. Saunders, Philadelphia, PA, 1999, pp.223-237.
- McCann ME, Anderson DR, Zhang D, Brideau C, Black WC, Hanson PD, Hickey GJ. In vitro effects and in vitro efficacy of a novel cyclooxygenase-2 inhibitor in dogs with experimentally induced synovitis. *Am J Vet Res*, 2004, 65: 503-12.
- Mealey KL, Matthews NS, Peck KE, Ray AC, Taylor TS. Comparative pharmacokinetics of phenylbutazone and its metabolite oxyphenbutazone in clinically normal horses and donkeys. *Am J Vet Res*, 1997, 58: 53-59.
- McKellar Q A, Bogan, von Felleberg R L: Pharmacokinetic, biochemical and tolerance studies on carprofen in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 1991, 23:280-284.

- Mehta V, Johnson A, Cheung R, Bello A, Langford RM. Intravenous parecoxib rapidly leads to COX-2 inhibitory concentration of valdecoxib in the central nervous system. *Clin Pharmacol Ther*, 2008, 83: 430-5.
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of a nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Nat Acad Sci, USA Proc* 15, 1993, 90: 11693-7.
- Morris DD, Rutkowski J, Lloyd KC: Therapy in two cases of neonatal foal septicaemia and meningitis with cefotaxime sodium, *Equine Vet J*, 1987, 19: 151-4.
- Murray MJ, Grodinsky C. Regional gastric pH measurement in horses and foals. *Equine Vet J*, 1989, 21: 73-6.
- Needleman P, Isakson PC. The discovery and function of COX-2. *Rheumatol*, 1997, 24: 6-8.
- Pairet M, Van Ryn J. Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*, 1998, 47: 93-101.
- Pleuvry BJ. Hysteresis in drug response. *Anaesth Intens Care Med*, 2005, 6: 286-87.
- Plumb DC 1999 Veterinary drugs handbook, third edn. Iowa state university press, Ames, IA.
- Pollimeier M, Toulemonde C, Fleshman C, Hanson PD. Clinical evaluation of firocoxib and carprofen for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet Rec*, 2006, 159: 547-51.
- Pohl P, Glupczynski Y, Marin M et al: Replicon typing characterization of plasmids encoding resistance to gentamicin and apramycin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* isolated from human and animal sources in Belgium, *Epidemiol Infect*, 1993, 111: 229-238.
- Rao RN, Meena S, Rao AR. An overview of the recent developments in analytical methodologies for determination of COX-2 inhibitors in bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39: 349-63.

- Rigau D, De la Cruz G, Pena J, Carbo M, Ramis I, Izquierdo I. UR-8880, a new potent COX-2 inhibitor: First administration into man to assess its tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Ann Reum Dis*, 2003, 62: 413.
- Ryan WG, Moldave K, Carithers D. Clinical effectiveness and safety of a new NSAID, firocoxib: a 1000 dog study. *Vet Ther*, 2006, 7: 119-26.
- Saccomanni G, Giorgi M, Del Carlo S, Manera C, Saba A, Macchia M. Simultaneous detection and qualification of parecoxib and valdecoxib in canine plasma by HPLC with spectrofluorimetric detection: development and validation of a new methodology. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401: 1681-8.
- Samitz EM, Jang SS, Hirsh DC: In vitro susceptibilities of selected obligate anaerobic bacteria obtained from bovine and equine sources to ceftiofur, *J Vet Diagn Invest* 8: 121-123, 1996.
- Schulze JD, Peters EE, Vickers AW, Staton JS, Coffin MD, Parsons GE, Basit AW. Excipient effects on gastrointestinal transit and drug absorption in Beagle dogs. *Intern J Pharm*, 2005, 300: 67-75.
- Seibert K, Masferrer J, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Geise J, Koboldt C, Anderson G, Bremer M, Gragory S. Expression and selective inhibition of constitutive and inducible form of cyclooxygenase. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 1995, 23: 125-7.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Isakson P. Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Adv Exp Med Biol*, 1997, 400: 167-70.
- Semrad S D, Sams R A, Harris O N et al 1993a Effects of concurrent administration of phenylbutazone and flunixin meglumine of pharmacokinetic variables and in vitro generation of thromboxane B₂ in mares. *American Journal of Veterinary Research* 54: 1901-5.
- Simon LS, Lanza FL, Lipsky PE, Hubbard RC, Talwalker S, Schwartz BD, Isakson PC, Geis GS. Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58365, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor: efficacy and safety in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects. *Arthritis Rheumatol*, 1998, 41: 1591-602.

- Sinclair MD, Mealey KL, Matthews NS, Peck KE, Taylor TS, Bennett BS. Comparative pharmacokinetics of meloxicam in clinically normal horses and donkeys. *Am J Vet Res*, 2006, 67: 1082-5.
- Smith WL, Song I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002, 68: 115-28.
- Snyder JR, Pascoe JR, Hietala SK et al: Gentamicin tissue concentrations in equine small intestine and large colon, *Am J Vet Res*, 1986, 47:1092-1095.
- Snow DH, Bacster P, Whiting B. The pharmacokinetic of meclofenamic acid in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and therapeutics*, 1981, 4: 147-156.
- Soma LR, Behrend E N, Rudy J A et al 1988 Disposition and excretion of flunixin meglumine in horses. *American Journal of Veterinary Research* 56: 1894-1898.
- Soraci AL, Mestorino ON, Errecalde JO: Pharmacokinetics of cefoperazone in horses, *J Vet Pharmacol Ther*, 1996, 19:39-43.
- Sorbera LA, Ramis I. Cimicoxib. Antiarthritic, analgesic, COX-2 inhibitor. *Drug Future*, 2004, 29: 325-30.
- Sweeney CR, Soma LR, Beech J et al: Pharmacokinetics of ticarcillin in the horse after intravenous and intramuscular administration, *Am J Vet Res*, 1984, 45: 1000-1002.
- Steagall PV, Mantovani FB, Ferreira TH, Salcedo ES, Moutinho FQ, Luna SPL. Evaluation of the adverse effects of oral firocoxib in healthy dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 2007, 30: 218-23.
- Tacconelli S, Capone ML, Sciulli MG, Ricciotti E, Partignani P. The biochemical selectivity of novel COX-2 inhibitors in whole blood assay of COX-isozyme activity. *Curr Med Res Opin*, 2002, 18: 503-11.
- Teng XW, Abu-Mellal AK, Davies NM. Formulation dependent pharmacokinetics, bioavailability and renal toxicity of a selective cyclooxygenase-1-inhibitor SC-560 in the rat. *J Pharm Pharmac Sci*, 2003, 6: 205-10.
- Tobyn T 1979 Pharmacology review: the non-steroidal anti-inflammatory drugs II. Equiproxen, meclofenamic acid, flunixin meglumine and others. *Journal of Equine Medicine and Surgery* 6:298-302.

- Torres-López JE, López-Muñoz FJ, Granados-Soto V. Pharmacokinetic – pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 282: 685-90.
- Tortora GJ, Anagnostikos NP. The lymphatic system and immunity. In: *Principles of Anatomy and Physiology*, Tortora GJ, Anagnostikos NP (Eds), Harper and Row publishers Ed, New York, NY, USA, 1990: 663-9.
- Toutain PL, Autefage A, Legrand C et al 1994 Plasma concentrations and therapeutic efficacy of phenylbutazone and flunixin meglumine in the horse: PC/PD modeling. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 17:459-469.
- Toutain PL. Pharmacokinetic / pharmacodynamic integration in drug development and dosage-regimen optimization for veterinary medicine. *AAPS J*, 2002, 4: 160-88.
- Toutain PL, Ferran A, Bousquet-Mélou A. Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Cunningham F, Elloitt J, Lees P (Eds). *Comparative Veterinary Pharmacology* Springer Berlin, Germany, 2010: 19-48.
- Traver DS, Riviere JE: Ampicillin in mares: a comparison of intramuscular sodium ampicillin or sodium ampicillin-ampicillin trihydrate injection, *Am J Vet Res*, 1982, 43:402-4.
- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs nature. *Nat New Biol*, 1971, 231: 232-5.
- Wagner J. *Pharmacokinetics for Pharmaceutical Scientist*. Technomic Publishing Company Inc, CRC Press Ed, 1993, Lancaster, PA, USA.
- Walter H. Hsu and Arthi Kanthasamay. NSAID in: *Handbook of veterinary pharmacology* W. Hsu (ed) Wiley Blackwell Ames Iowa USA, 2008, pp 153-170.
- Walter KL, Burns DK, Brown TG. Inflammation and repair. In: *Pathology: The Big Picture*, Kemp W, Burns Dennis, Brown T, (Eds), Mc Graw-Hill Lange Ed, New York, NY, USA, 2008: 13-21.
- Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated

with human gastrointestinal toxicity: A full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 46: 7563-8.

- Welsh JCM, Lees P, Stodulski G et al 1992 Influence of feeding schedule on the absorption of orally administered flunixin meglumine in the horse. *Equine Veterinary Journal Supplement* 124:62-65.
- Wilson RC, Moore JN, Eakle N: Gentamicin pharmacokinetics in horses given small doses of *Escherichia coli* endotoxin, *Am J Vet Res*, 1983, 44:1746-1749.
- William M, Jim Schumacher, Jhon Schumacher: Joint injection and regional anesthesia, *Veterinary learning systems* ed 2007 USA.
- Yousef MK, Dill DB, Mayes MG. Shift in body fluids during dehydration in the burro, *Equus asinus*. *J Appl Physiol*, 1970, 29: 345-9.
- Zizzadoro C, Belloli C. Sistemi degli autocodi e sua modulazione farmacologica. In: *Farmacologia Veterinaria*. Carli S, Ormas P, Re G, Soldani G, (Eds), Idelson-Gnocchi Ed, Napoli, Italia, 2009: 363-474.

8. Ringraziamenti

Sono molte le persone da ringraziare al termine di questo percorso; il primo ringraziamento va senz'altro alla mia famiglia: a mamma e babbo per avermi incoraggiato ed aver avuto sempre una parola di conforto durante tutti questi anni di studio ed in particolar modo nei momenti più difficili, quelli nei quali tutto sembrava andare nella direzione sbagliata e grazie a voi sono stati superati. Grazie per essere stati giorno dopo giorno un esempio di vita meraviglioso da seguire, senza di voi non sarei diventato l'uomo che sono oggi. Grazie a mio fratello, "Simo", per essere stato il mio supporto tecnico-logistico durante questa stesura finale, per aver sopportato tutte le mie lamentele ed aver sempre sdrammatizzato con un sorriso...siamo forti insieme!!

Grazie alla mia "seconda mamma", la zia Giò, per avermi insegnato ad affrontare la vita con ottimismo nonostante le difficoltà che questa ci riserva, per riuscire come nessun'altro a strapparmi un sorriso e mettermi di buon umore anche nelle giornate più cupe. Grazie allo Zio ed ai Nonni per aver sempre avuto una parola di conforto ed un poco di tempo da dedicarmi; grazie soprattutto a te Nonno per avermi trasmesso fin da bambino l'amore per gli animali e per la natura, senza la quale probabilmente non avrei mai intrapreso questa strada.

Vorrei ringraziare la Dott.ssa Micaela Sgorbini, per avermi dato la possibilità di scoprire un mondo a me del tutto sconosciuto fino al quarto anno di studi; grazie per i suoi insegnamenti, per avermi trasmesso la passione e la dedizione verso questa professione ed avermi dato fiducia in questi anni.

Grazie al Dott. Mario Giorgi per l'aiuto ed il tempo dedicatomi nella stesura di questa tesi, per la sua disponibilità ed i suoi preziosi consigli.

Un grazie di cuore va a tutti i miei compagni di turno, i "cavallari", perché essere cavallari non è soltanto una professione ma uno stile di vita!! Siete tantissimi: Giulietta, Samuele, Margherita, Andrea, Federico, Claudia, Laura, Silvia, Francesca, Chiara, Serena, Mirco, Matteo, Margherita, Costanza, Luca, Cinzia, Lorenzo; grazie mille per le notti passate insieme in giro per la Toscana a veder nascere puledri, per tutti i giorni di turno passati insieme, per l'aiuto nella raccolta dei dati della tesi, per le grigliate e le feste di questi anni, ma soprattutto

per essere una grade famiglia nella quale mi sono trovato a mio agio e dalla quale ho sempre avuto conforto durante questi anni.

Grazie a Michele e Luca, siete come fratelli per me. Dicono che gli amici veri si contano sulle dita di una mano, bè questo è il nostro caso...grazie per esserci sempre e comunque amici!!

Un grazie speciale va ai miei compagni di squadra: Checco, Giova, i Lazze, Fede, Enzino, Pana, Tommy; oggi così come quando avevamo 6 anni, ci basta una palla a spicchi ed un parquet per divertirci ore ed ore senza mai sentire la fatica.

Per 20 anni il "Pala Sartori" è stato la mia seconda casa e voi degli inseparabili compagni, con voi ho condiviso gioie e dolori, ho imparato che il lavoro e la fatica portano sempre ad un risultato nello sport come nella vita.

Grazie ai miei storici compagni di corso: Guido, Edoardo, Francesco, Davide, Daniele, Domenico, per le mille serate pisane e soprattutto per essere dei veri amici, con i quali spero di rimanere in contatto nonostante i futuri impegni.

Grazie al mio "compagno di sventure", Giulio; abbiamo affrontato mille battaglie in questo ultimo anno, dobbiamo vincere anche questa!!

Grazie a te Giulietta e ad Andrea, oltre ad essere dei "colleghi" siete degli amici stupendi, le nostre vacanze sono state sempre memorabili...spero che nonostante la distanza riusciremo un giorno a riunirci.

Ultimo ringraziamento, ma certo non meno importante degli altri, va a te Ale...grazie per aver reso la mia vita semplicemente più bella in questi ultimi due anni, per aver creduto in me ed essere stata l'unica ad andare oltre i pregiudizi, per rubarmi un sorriso ogni volta che ti vedo, per avermi sopportato in questo ultimo mese ed per esserci sempre stata nonostante la lontananza.